

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 907**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

C40B 40/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2017 PCT/EP2017/055002**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017 WO17149117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2017 E 17708763 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3423578**

54 Título: **Biblioteca de polipéptidos**

30 Prioridad:

04.03.2016 EP 16158782

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

09.02.2021

73 Titular/es:

**MORPHOSYS AG (100.0%)
Simmelweisstrasse 7
82152 Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**MÜLLER, ROGER;
BÜLTMANN, ANDREAS;
PRASSLER, JOSEF y
MOOSMEIER, MARKUS**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 804 907 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

Biblioteca de polipéptidos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a nuevas bibliotecas de polipéptidos que están limitadas conformacionalmente en una disposición antiparalela, hélice-giro-hélice. La invención se refiere además a procedimientos para generar y seleccionar tales bibliotecas para usos biológicos, farmacéuticos y otros.

10

Antecedentes de la invención

15

Las bibliotecas de péptidos han surgido como un poderoso recurso para identificar moléculas terapéuticamente relevantes. Además, las bibliotecas de péptidos también son recursos relevantes para muchos otros fines y para la investigación básica.

20

Terapéuticamente, los péptidos tienen ciertas ventajas sobre las moléculas pequeñas y los productos biológicos grandes, tales como los anticuerpos. En comparación con las moléculas pequeñas, los péptidos suelen tener una interfaz de interacción más grande con un antígeno, que comprende enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Esto conduce a una unión de alta afinidad, una alta especificidad para el antígeno y típicamente una alta potencia. En comparación con los anticuerpos, los péptidos son mucho más pequeños y, por lo tanto, generalmente penetran en el tejido más fácilmente. Ciertos tumores son inaccesibles para la terapia con anticuerpos.

25

Existen numerosas bibliotecas de péptidos de presentación en fagos, que incluyen bibliotecas que utilizan péptidos restringidos. Los péptidos de restricción superan ciertas desventajas que están asociadas con los péptidos lineales, incluidas las afinidades de unión débiles debido a una mayor flexibilidad conformacional y una mayor susceptibilidad a la degradación proteolítica en el cuerpo humano.

30

Un motivo restringido natural de (poli)péptidos es el haz de hélice α . Las hélices α constituyen la clase más grande de estructuras secundarias de proteínas y juegan un papel importante en la mediación de las interacciones proteína-proteína. Sin embargo, los péptidos sintéticos cortos de 10-30 aminoácidos de longitud generalmente no son hélices termodinámicamente estables en agua y adoptan solo estructuras aleatorias (Harrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010 29 de junio; 107 (26))

35

Los haces de hélices α pueden aparecer en diferentes formas, incluyendo dos, cuatro o incluso múltiples haces. Los péptidos individuales de hélice α en tales proteínas de haz pueden orientarse en una disposición paralela o antiparalela, formando así estructuras de hélice superenrolladas en las que los ejes de las hélices están alineados ligeramente desplazados entre sí.

40

Las estructuras de hélice α que se producen en dichos haces generalmente comprenden repeticiones heptad con un perfil que consiste en un exterior hidrófilo, un interior hidrófobo y un borde de residuos de aminoácidos polares que forman interacciones de puente salino dentro de las hélices.

45

Muchas proteínas naturales, como la queratina, la miosina, la epidermina, el fibrinógeno y la tropomiosina, tienen una estructura de hélice superenrollada formada por dos péptidos de hélice α dimerizados. Además, las estructuras de hélice superenrollada se encuentran con frecuencia en las proteínas de unión al ADN, en las que este motivo se denomina cremallera de leucina.

50

Los dominios de hélice superenrollada también se encuentran en Jun, Fos (O'Shea et al., Science. 245: 646-648 (1989)), C/EBP (Landschultz et al., Science. 240: 1759- 1764 (1988)) y, por ejemplo, en proteínas de unión a GCN4 (O'Shea et al., Science. 242: 538-542 (1989)). La estructura hélice superenrollada de hélice α que ocurre naturalmente a menudo se encuentra en una orientación paralela, que se cree que es una conformación estable.

55

Se han descrito enfoques para adaptar tales estructuras para diseñar moléculas de reconocimiento específicas. El documento WO94/29332 describe polipéptidos que contienen hélices superenrolladas antiparalelas en las que dichos estructuras se modificaron para incorporar secuencias de reconocimiento helicoidales de proteínas naturales tales como proteínas de unión a ADN y citocinas.

60

La patente de Estados Unidos No. 5.824.483 describe la construcción de una biblioteca combinatoria de péptidos de hélice α diseñada nueva y químicamente sintetizada. Los péptidos de hélice α se estabilizaron mediante puentes de lactama entre hélices y, opcionalmente, mediante un segundo péptido adicional de hélice α , dando como resultado una estructura de hélice superenrollada dimérica en una orientación paralela o antiparalela. Sin embargo, la única biblioteca de péptidos habilitada abarcaba una única cadena de polipéptidos de hélice α de 24 aminoácidos de longitud que se estabiliza a través de dos puentes de lactama entre hélices y que se diversifica en 5 posiciones de aminoácidos.

65

- 5 Fujii et al., (Tetrahedron Letters 42, 3323-3325 (2001)) describen un enfoque más específico para una biblioteca basada en hélice-giro-hélice. La publicación científica describe una biblioteca nueva de péptidos de hélice-giro-hélice orientada en forma antiparalela químicamente sintetizada en la que los péptidos terminales amino y carboxilo están unidos a través de un enlazador basado en glicina. Cada uno de los dos péptidos formadores de hélice-giro-hélice constaba de 14 aminoácidos y se estabilizó mediante interacciones hidrófobas con residuos de leucina en las dos hélices respectivas. A diferencia de la biblioteca de la presente divulgación, solo el péptido de la hélice del terminal carboxilo se diversificó en 3 posiciones expuestas al disolvente con una mezcla de 5 residuos de aminoácidos naturales.
- 10 Un procedimiento complementario para utilizar una biblioteca de péptidos es la presentación de dichas bibliotecas en bacteriófagos filamentosos. Este procedimiento permite la preparación de bibliotecas tan grandes como 10^{10} miembros de péptidos únicos, muchos órdenes de magnitud más grandes que las bibliotecas que pueden prepararse sintéticamente.
- 15 Fujii y Colaboradores describieron una biblioteca de péptidos de hélice-giro-hélice orientada en forma antiparalela presentada en fagos en 2008 (Biochemistry, 47, 6745-6751 (2008)). En contraste con la biblioteca mencionada anteriormente, el péptido de la hélice del terminal carboxilo se aleatorizó en 5 regiones expuestas a disolventes obteniéndose un tamaño de biblioteca teórico de $3,2 \times 10^6$. La biblioteca se presentó en la proteína VIII de la cubierta principal del fago filamentosos con un enlazador de glicina/serina junto con una etiqueta detectable. Fujii et al., describieron más detalladamente una utilización particular de la biblioteca de péptidos hélice-giro-hélice para generar "Microanticuerpos" en 2011 (Drug Delivery System, 26-6, 2011, páginas 593-603), en 2009 (Yakugaku Zasshi, 129 (11), 1303-1309, 2009) y 2013 (Current Protocols in Chemical Biology, volumen 5 (3), 171-194, 2013).
- 20 Una característica estructural común de las dos bibliotecas descritas por Fujii y colaboradores es el uso predominante de alanina en las posiciones expuestas al disolvente de los dos péptidos de hélice α . Se sabe que los tramos de alanina (polialanina) facilitan la formación de estructuras de hélice α , pero también pueden mostrar baja solubilidad en soluciones acuosas y, por lo tanto, son propensos a la agregación.
- 25 Más importante aún, las bibliotecas descritas por Fujii y colaboradores solo se diversifican dentro del péptido de hélice α del terminal carboxilo mediante la diversificación de las posiciones de alanina expuestas al disolvente. En este escenario, se cree que el péptido del terminal amino no diversificado retiene su estructura de hélice α y estabiliza la estructura de hélice-giro-hélice de la molécula. Sin embargo, la aleatorización del péptido de hélice α del terminal carboxilo provisto por Fujii todavía dio como resultado miembros de la biblioteca con conformaciones aleatorias múltiples no deseadas que requerían un proceso de purificación particular para enriquecer estructuras de hélice-giro-hélice correctamente plegadas (Fujii et al., (Tetrahedron Letters 42, 3323-3325 (2001))).
- 30 Una desventaja importante de diversificar solo uno de los dos péptidos de hélice α radica en el hecho de que el enfoque limita significativamente el tamaño alcanzable de la biblioteca y reduce significativamente la interacción entre fases entre los polipéptidos de la biblioteca y sus moléculas objetivo de interés unidas resultando en especificidad y afinidad reducidas.
- 35 Con base en las limitaciones de los enfoques mencionados anteriormente, todavía existe una necesidad insatisfecha de desarrollar bibliotecas mejoradas de polipéptidos de hélice-giro-hélice de tamaño considerable.
- 40 La biblioteca de la presente divulgación difiere en múltiples formas de las bibliotecas descritas por Fujii. El diseño de la biblioteca de la presente divulgación se basa en un enfoque combinado que tiene en cuenta factores estadísticos, estructurales y racionales. Esto incluyó en primera instancia el análisis y el uso de los residuos de aminoácidos más abundantes encontrados en posiciones dadas en estructuras de hélice α naturales. Se considera que tales aminoácidos tienen propiedades biofísicas favorables que incluyen baja inmunogenicidad, resistencia a la temperatura y desnaturalización química, insensibilidad relativa a las alteraciones del pH, estabilidad en suero y resistencia a la degradación proteolítica por proteasas.
- 45 En segundo lugar, las posiciones variables dentro de la biblioteca de hélice-giro-hélice de la presente divulgación están presentes tanto en el péptido de hélice α del terminal amino como del terminal carboxilo y se muestran en la misma orientación paralela relativa. Estas dos características permiten la formación de una interfaz de interacción amplia y plana en toda la longitud de la molécula hélice-giro-hélice. La interfaz de interacción ampliada es crucial para una interacción óptima proteína-proteína con un antígeno objetivo de interés que da como resultado una especificidad y afinidad mejoradas, ambos aspectos críticos en el desarrollo de moléculas terapéuticas.
- 50 Además, para evitar una posible desestabilización del armazón de hélice-giro-hélice causada por la introducción de un gran número de posiciones variables en ambos péptidos de hélice α , la consideración estructural adicional para promover la formación de hélice y estabilizar la estructura de hélice-giro-hélice se tuvo en cuenta para seleccionar el residuo de aminoácido más apropiado en cada posición invariable. Estos residuos de aminoácidos se seleccionaron para estabilizar la estructura molecular mediante interacciones electrostáticas entre hélices y dentro de las hélices y enlaces de hidrógeno dentro de las hélices.
- 55
- 60
- 65

En resumen, la biblioteca de la presente divulgación supera las limitaciones de las bibliotecas de hélice-giro-hélice descritas por Fujii y colaboradores al maximizar el número de posiciones diversificadas sin comprometer las estructuras estabilizadoras de hélice α que conducen a un desarrollo más eficiente de los polipéptidos resultantes y un aumento en la seguridad y eficacia de las respectivas terapias en pacientes.

5

Sumario de la invención

La presente divulgación describe una biblioteca de polipéptidos de hélice-giro-hélice (HTH), que se caracteriza por un tamaño de biblioteca extraordinariamente grande. Los polipéptidos pueden aislarse de esta biblioteca, que se une a moléculas objetivo de interés con alta afinidad, especificidad y funcionalidad.

10

Preferiblemente, dicha biblioteca de polipéptidos es una biblioteca de presentación en fagos.

15

Las variaciones de secuencia de la biblioteca de la presente divulgación están presentes en ambos dominios de hélice α del armazón de HTH. Por lo tanto, los polipéptidos codificados por la biblioteca pueden unirse a, por ejemplo, un receptor con dos o más sitios de unión espacialmente distintos pero relacionados. Las posiciones variables presentes en ambos dominios de hélice α pueden contribuir aún más a una interfase de interacción ampliada entre un polipéptido particular y su antígeno objetivo, lo que da como resultado una especificidad y afinidad mejoradas.

20

En otro aspecto de la presente divulgación, las posiciones diversificadas de residuos de aminoácidos se ubican en las regiones expuestas a disolvente del armazón de HTH como se describe en el presente documento.

25

La biblioteca de la presente divulgación se puede diversificar en hasta 12 posiciones de aminoácidos, cada una con una mezcla de hasta 17 residuos de aminoácidos naturales. Por lo tanto, se puede lograr un tamaño de biblioteca superior a 1×10^{11} .

30

También se encontró que los polipéptidos aislados de la biblioteca tienen varias propiedades superiores sobre los agentes de unión de inmunoglobulina y no inmunoglobulina tradicionales. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, su tamaño compacto y pequeño (~6 kDa), baja inmunogenicidad, extrema estabilidad contra la desnaturalización térmica y química, relativamente insensible a los cambios en el pH y a la degradación proteolítica.

35

La biblioteca de la presente divulgación puede usarse para identificar moléculas para uso terapéutico, o puede usarse para caracterizar tales moléculas por medios, tales como mapeo de epítomos.

40

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una biblioteca de polipéptidos, en la que cada miembro de la biblioteca comprende una estructura de armazón de hélice-giro-hélice de la fórmula Hélice-1 - Li - Hélice-2, en la que

45

Hélice-1 y Hélice-2 comprenden un primer y segundo péptido de hélice α , en el que cada uno de dichos péptidos de hélice α comprende la secuencia de aminoácidos

X1 - X2 - Hy - Var1 - X3 - Hy - Var1 - Var2 - X4 - Hy - Var1 - X5 - Hy - Var1 - Var3 (SEQ ID NO: 1),

50

en la que

X1 es D, T, N, S o P,

X2 es E, P, Q, W o D,

55

X3 es M, A, I, Q o R,

X4 es A, L, R, M, K o E,

60

X5 es M, L, A, W, F o K,

Hy es cualquier residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobicidad mayor que 0,62, y

Var1, Var2 y Var3 son mezclas de los aminoácidos naturales, excluyendo G, P y C,

65

Li es un enlazador y

dicho primer y segundo péptido de hélice α forman una estructura de hélice superenrollada antiparalela.

70

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, el enlazador Li comprende de 1 a 30 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 2).

En otra realización de la presente divulgación (SEQ ID NO: 3),

5 X1 es D,

X2 es E,

X3 es Q en la Hélice-1 y A en la Hélice-2,

10 X4 es E en la Hélice-1 y K en la Hélice-2, y

X5 es K en la Hélice-1 y M en la Hélice-2.

En una realización, la presente divulgación proporciona una biblioteca, en la que Hy es L, V o I (SEQ ID NO: 4).

15 En una realización, la presente divulgación proporciona una biblioteca (SEQ ID NO: 5), en la que

Var2 es una mezcla de E, R y Q, y
Var3 es una mezcla de R, Q y H.

20 En una realización adicional de la presente divulgación, los polipéptidos de la biblioteca se presentan en bacteriófagos.

25 En una realización adicional de la presente divulgación, la biblioteca comprende al menos 1×10^6 miembros de polipéptido.

En una realización adicional de la presente divulgación, cada miembro de la biblioteca está unido a al menos una fracción adicional.

30 En una realización de la presente divulgación, dicho fracción adicional es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, una toxina, una citocina, una enzima informadora, una fracción capaz de unirse a un ion metálico, una etiqueta adecuada para detección y/o purificación, un dominio de homo o hetero asociación, una fracción que aumenta la solubilidad de una proteína, o una fracción que comprende un sitio de escisión enzimática.

35 En una realización adicional, la presente divulgación proporciona una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican los miembros de la biblioteca de la presente divulgación.

40 En una realización adicional, la presente divulgación proporciona un vector que comprende la colección de moléculas de ácido nucleico que codifican los miembros de la biblioteca de la presente divulgación. En ciertas realizaciones, dicho vector es un vector de presentación o un vector de expresión.

En una realización adicional, la presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende la colección de moléculas de ácido nucleico o el vector que codifica los miembros de la biblioteca de la presente divulgación.

45 En una realización adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento para aislar un polipéptido específico para un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a. poner en contacto la biblioteca de acuerdo con la presente divulgación con un antígeno;

50 b. remover aquellos miembros de la biblioteca que no se unen al antígeno; y

c. recuperar aquellos miembros de la biblioteca que se unieron al antígeno.

55 En una realización, la presente divulgación proporciona una estructura de armazón de hélice-giro-hélice de la fórmula Hélice-1 - Li - Hélice-2 unida a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en la que Hélice-1 y Hélice-2 comprenden un primer y segundo péptido de hélice α que forman una estructura de hélice superenrollada antiparalela, en la que cada uno de dichos péptidos de hélice α comprende la secuencia de aminoácidos

X1 - X2 - Hy - Var1 - X3 - Hy - Var1 - Var2 - X4 - Hy - Var1 - X5 - Hy - Var1 - Var3 (SEQ ID NO: 1),

60 en la que

X1 es D, T, N, S o P,

65 X2 es E, P, Q, W o D,

X3 es M, A, I, Q o R,

X4 es A, L, R, M, K o E,

5 X5 es M, L, A, W, F o K.

Hy es cualquier residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobicidad mayor que 0,62, y

10 Var1, Var2 y Var3 son mezclas de los aminoácidos naturales, excluyendo G, P y C, y

Li es un enlazador.

Definiciones

15 Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto por" tal como se usa en el presente documento son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen, miembros no mencionados, elementos o etapas del procedimiento adicionales.

20 "Biblioteca" significa una entidad que comprende más de un miembro. En el contexto de la presente divulgación, este término se refiere a una biblioteca de polipéptidos, en la que dicha biblioteca comprende al menos dos polipéptidos diferentes.

Por el término "péptido" se entiende una molécula corta que tiene menos de o igual a 20 aminoácidos.

25 El término "polipéptido" significa una molécula que tiene más de 20 aminoácidos.

Una "proteína de fusión" es un polipéptido que tiene dos porciones unidas covalentemente entre sí, en la que cada una de las porciones es un péptido o polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una simple propiedad química o física, tal como la unión a una molécula objetivo, la catálisis de una reacción, etc. Las dos porciones pueden estar unidas directamente por un enlace peptídico único o mediante un espaciador peptídico que contiene una o más residuos de ácidos, Generalmente, las dos porciones y el espaciador estarán en el marco de lectura entre sí.

35 Como se usa en el presente documento, el término "armazón de hélice-giro-hélice" o "armazón de HTH" se refiere a una estructura secundaria de un polipéptido en el que dos hélices α están orientadas en una orientación paralela o antiparalela, y en la que las dos hélices α están unidas a través de un tramo corto de aminoácidos.

40 Los términos "heptad", "unidad heptad", "unidad de repetición heptad" y "motivo heptad" se usan indistintamente en este documento y se refieren a un fragmento peptídico de 7 mer que se repite dos o más veces dentro de un armazón de HTH. La estructura terciaria de una hélice α es tal que 7 residuos de aminoácidos en la secuencia primaria corresponden a aproximadamente 2 giros de la hélice α . En consecuencia, una secuencia de aminoácidos primaria que da lugar a una conformación de hélice α puede descomponerse en unidades de 7 residuos cada una. Las posiciones individuales de una unidad heptad se denotan con letras minúsculas, es decir, una unidad heptad se representa, por ejemplo, mediante la secuencia 'abcdefg', 'bcdefga', 'cdefgab', 'defgabc', 'efgabcd', 'fgabcde' o 'gabcdef'. La posición 'a' y 'd' de una unidad heptad ensamblada en un armazón de HTH de la presente divulgación son de naturaleza hidrófoba. Estas posiciones son típicamente leucina, isoleucina o valina, y la estructura secundaria paralela o antiparalela del HTH está formada por interacciones hidrófobas a través de estas posiciones entre diferentes unidades heptad presentes en dos péptidos de hélice α distintos.

Los términos "hélice superenrollada" y "estructura de hélice superenrollada" se usan indistintamente en el presente documento y serán claros para el experto en la materia basándose en el conocimiento general común y la descripción y referencias adicionales citadas en el presente documento. En general, la naturaleza utiliza una estructura de hélice superenrollada para estabilizar las hélices α en las proteínas. Una hélice superenrollada es un motivo estructural en polipéptidos o proteínas en el que se enrollan juntas 2 a 7 hélices α . La formación de hélice superenrollada de péptidos de hélice α se facilita a través de un entierro de cadenas laterales hidrófobas al colocarlas en un lado de las hélices α para que las moléculas de agua polar no tengan acceso a ellas. Un motivo típico de hélice superenrollada (4-3 repeticiones hidrófobas) es una repetición heptada de aminoácidos de 'a' a 'g', de modo que 'a' y 'd' son hidrófobas. Se hace referencia particular a este respecto para revisar documentos relativos a estructuras de hélice superenrollada, tales como por ejemplo, Cohen y Parry, *Proteins* 1990, 7: 1-15; Kohn y Hodges, *Trends Biotechnol* 1998, 16: 379-389; Schneider et al., *Fold Des* 1998, 3: R29-R40; Harbury et al., *Science* 1998, 282: 1462-1467; Mason y Arndt, *Chem Bio Chem* 2004, 5: 170-176; Lupas y Gruber, *Adv Protein Chem* 2005, 70: 37-78; Woolfson, *Adv Protein Chem* 2005, 70: 79-112; Parry et al., *J Struct Biol* 2008, 163: 258-269; McFarlane et al., *Eur J Pharmacol* 2009, 625: 101-107.

Como se usa en este documento, el término "antiparalelo" se refiere a un armazón de HTH en el que dos péptidos de hélice α de un armazón de HTH están dispuestos de modo que el extremo terminal amino de un péptido de hélice α está alineado con el extremo terminal carboxilo del segundo péptido de hélice α , y viceversa. Por lo tanto, la orientación relativa de las posiciones heptad 'a-g' de dos hélices α que interactúan alineadas en una orientación antiparalela está en la dirección opuesta. Por ejemplo, si las posiciones heptad de una primera hélice se definen como 'abcdefg' como se lee desde el terminal amino al carboxilo, las posiciones heptad de una segunda hélice α en una orientación antiparalela se definirán como 'gfedcba' tal como se lee desde el terminal amino al carboxilo.

Como se usa en el presente documento, el término "paralelo" se refiere a un armazón de HTH en el que los dos péptidos de hélice α están alineados de modo que tengan la misma orientación de modo que el extremo terminal amino de una hélice esté alineado con el extremo terminal amino de la segunda hélice α , y viceversa. Por lo tanto, la orientación relativa de las posiciones heptad 'a-g' de dos péptidos de hélice α que interactúan alineados en orientación paralela está en la misma dirección. Por ejemplo, si las posiciones heptad de una primera hélice se definen como 'abcdefg' desde el terminal amino al terminal carboxilo, las posiciones heptad de una segunda hélice en una orientación paralela también se definirían como 'abcdefg' como se lee desde el terminal amino al terminal carboxilo.

Los términos "enlazador", "giro", "secuencia de enlace" o "secuencia de giro" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un fragmento de secuencia de aminoácidos que forma parte de la secuencia de aminoácidos contigua de un polipéptido HTH, y se une covalentemente a dos secuencias de péptidos de hélice α de ese polipéptido.

Como se usa en el presente documento, el término "cadena sencilla" se refiere al armazón de HTH de la presente divulgación, en el que la estructura de hélice superenrollada estabilizadora se forma a partir de diferentes regiones de una secuencia de aminoácidos contigua de una cadena de polipéptidos HTH plegada de nuevo de una manera apropiada

El término "orientado al disolvente" o "expuesto al disolvente" se refiere a la región de una entidad que está directamente expuesta o que entra directamente en contacto con el disolvente en el ambiente o el medio en el que está presente. En el contexto de la presente divulgación, es la hélice α o una parte de la hélice α de un armazón de HTH que está directamente expuesto o que entra directamente en contacto con el disolvente en el ambiente o el medio en el que está presente. Más particularmente, en el contexto de un sitio de unión, en el que uno o más aminoácidos ubicados en una parte orientada al disolvente del armazón de HTH contribuyen al sitio de unión, se considera que el sitio de unión está formado por una parte orientada al disolvente del armazón de HTH.

Una "parte de la hélice α " de un polipéptido se refiere a una parte de un polipéptido de la presente divulgación que tiene una estructura secundaria de hélice α .

El "núcleo hidrófobo" de un armazón de HTH se refiere a la parte en un armazón de HTH que no está directamente expuesta al disolvente en el que está presente.

Como se usa en el presente documento, un polipéptido de la presente divulgación "se une específicamente a", "específicamente se une a", es "específico a/para" o "reconoce específicamente" un antígeno si dicho polipéptido es capaz de discriminar entre dicho antígeno y uno o más antígenos de referencia, ya que la especificidad de unión no es una propiedad absoluta, sino relativa. El antígeno o antígenos de referencia pueden ser uno o más antígenos estrechamente relacionados, que se utilizan como puntos de referencia. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar con un ensayo ELISA estándar. Los procedimientos alternativos comprenden, pero no se limitan a transferencias Western, pruebas ELISA, RIA, ECL, IRMA y escaneos de péptidos. La puntuación puede llevarse a cabo mediante el desarrollo de color estándar (por ejemplo, de detección de anticuerpos con peróxido de rábano picante y tetrametilbencidina con peróxido de hidrógeno). La reacción en ciertos pocillos se puntúa por la densidad óptica, por ejemplo, a 450 nm. El fondo típico (= reacción negativa) puede ser una DO de 0,1; la reacción positiva típica puede ser de una OD de 1. Esto significa que la diferencia positiva/negativa puede ser mayor de 10 veces. Típicamente, la determinación de la especificidad de unión se realiza utilizando no un solo antígeno de referencia, sino un conjunto de aproximadamente tres a cinco antígenos no relacionados, tales como leche en polvo, BSA, transferrina o similares. Además, la "unión específica" puede relacionarse con la capacidad de discriminar entre diferentes partes de su antígeno objetivo, por ejemplo, diferentes dominios o regiones de dicho antígeno objetivo, o entre uno o más residuos de aminoácidos clave o tramos de residuos de aminoácidos de un antígeno objetivo.

La "afinidad" de un polipéptido está representada por la constante de equilibrio para la disociación del polipéptido y la proteína objetivo de interés a la que se une. Cuanto más bajo es el valor de K_D , más fuerte es la fuerza de unión entre dicho polipéptido y la proteína objetivo de interés a la que se une. Alternativamente, la afinidad también se puede expresar en términos de la constante de afinidad (K_A), que corresponde a $1/K_D$. La afinidad de unión de un polipéptido se puede determinar de una manera conocida por la persona experta, dependiendo de la proteína objetivo específica de interés. En general, se sabe en la técnica que la K_D puede expresarse como la relación de la constante de velocidad de disociación de un complejo, denotado como $k_{\text{disociación}}$ (expresada en segundos⁻¹ o s⁻¹), con respecto a la constante de velocidad de su asociación, denotada como $k_{\text{asociación}}$ (expresada en molar⁻¹

segundos⁻¹ o M⁻¹ s⁻¹). Se considera que un valor de K_D superior a aproximadamente 1 milimolar indica unión no específica o no vinculante.

5 Los términos "posición diversificada de residuo de aminoácido" o "posición variante de residuo de aminoácido" se refieren a una posición de residuo de aminoácido en la que pueden estar presentes al menos dos residuos de aminoácido diferentes.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "que inhibe", "que reduce" y/o "que previene" se refieren a un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación que se une específicamente a una proteína objetivo de interés e inhibe, reduce y/o evita la interacción entre esa proteína objetivo de interés, y su compañero de unión natural y/o inhibe, reduce y/o previene una actividad biológica de esa proteína objetivo de interés. La actividad inhibidora o antagonista de un polipéptido de la presente divulgación puede ser reversible o irreversible, pero para aplicaciones farmacéuticas y farmacológicas típicamente ocurrirá reversiblemente. La actividad inhibidora o antagonista de un polipéptido de la presente divulgación puede medirse usando un ensayo adecuado *in vitro*, celular o *in vivo*.

15 El término "sintético" describe una molécula que se produce fuera del cuerpo humano mediante síntesis o sintetizada, por ejemplo, ADN. El término "sintético" también describe una proteína, por ejemplo, anticuerpo o fragmento que se traduce de una molécula sintética de ADN.

20 "Lineal" como se usa en la presente divulgación se refiere a un tramo de aminoácidos o un (poli)péptido que no incluye ninguna estructura circular secundaria o terciaria.

25 El término "aislado" se refiere a un compuesto que puede ser por ejemplo, un polipéptido de la divulgación o una fracción de unión a antígeno que está sustancialmente libre de otros polipéptidos o fracciones de unión a antígeno que tienen diferentes especificidades antigénicas. Además, un polipéptido aislado o fracción de unión a antígeno puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

30 "Restringido" como se usa en la presente divulgación se refiere a un péptido en el que la estructura tridimensional se mantiene sustancialmente en una disposición espacial a lo largo del tiempo. Los polipéptidos dentro de la presente divulgación tienen una conformación restringida. Los procedimientos para determinar si los péptidos están restringidos son conocidos en la técnica.

35 "Miembro" como se usa en la presente divulgación se refiere a una molécula que forma parte de una biblioteca. En el contexto de la presente divulgación, este término se refiere a un polipéptido que es parte de la biblioteca de polipéptidos.

40 La "mezcla" como se usa en la presente divulgación se refiere a una solución que contiene más de una molécula y en la que al menos dos moléculas son diferentes. Este término se usa particularmente para describir la composición de aminoácidos en una posición dada o para describir los codones que codifican los codones respectivos para una posición dada. Por ejemplo, cada codón seleccionado tiene una cierta probabilidad de ocurrir en una posición diversificada. Por ejemplo, si Var1 representa una "mezcla igual" de los aminoácidos naturales, entonces cada uno de los 20 aminoácidos naturales tiene la misma probabilidad de ocurrir en esa posición, es decir, 5%.

45 Como se usa en este documento, los residuos de aminoácidos se indicarán por su nombre completo o de acuerdo con el código de aminoácidos estándar de tres letras o una letra. "Aminoácidos naturales" significa los siguientes aminoácidos:

Tabla 1: aminoácidos

Amino ácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F

Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

5 "Residuo de aminoácido hidrófobo" se refiere a un aminoácido o residuo que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobicidad mayor que cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg et al., (1984, J. Mol. Biol. 179: 125-142). Los aminoácidos hidrófobos codificados genéticamente incluyen P, I, F, V, L, W, M, A y Y.

Tabla 2:
Escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg

Escala de consenso de Eisenberg (ECS)																			
R	K	D	Q	N	E	H	S	T	P	Y	C	G	A	M	W	L	V	F	I
-2,5	-1,5	-0,90	-0,85	-0,78	-0,74	-0,40	-0,18	-0,05	0,12	0,26	0,29	0,48	0,62	0,64	0,71	1,1	1,1	1,2	1,4

10 El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha unido. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Los vectores pueden ser compatibles con células procariotas o eucariotas. Los vectores procariotas típicamente incluyen un replicón procariota que puede incluir un promotor procariota capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) del péptido en una célula huésped bacteriana, tal como *Escherichia coli* transformada con ella. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite que se produzca la unión de la ARN polimerasa y la transcripción. Las secuencias promotoras compatibles con huéspedes bacterianos se proporcionan típicamente en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN. Los ejemplos de tales plásmidos vectoriales incluyen pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329, pPL y pKK223, disponibles comercialmente.

Los "vectores de expresión" son aquellos vectores capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente y están destinados a incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación defectuosa), que cumplen funciones equivalentes.

El "vector de presentación" incluye una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante extra cromosómicamente en una célula huésped, tal como una célula huésped bacteriana, transformada con la misma. Dichas secuencias de ADN son bien conocidas en la técnica. Los vectores de presentación pueden ser, por ejemplo, vectores de fagos o vectores de fagémidos procedentes de la clase de bacteriófagos filamentosos fd, M13 o fl. Dichos vectores son capaces de facilitar la presentación de una proteína que incluye, por ejemplo, una proteína de unión o un fragmento de la misma, en la superficie de un bacteriófago filamentoso. Los vectores de presentación adecuados para la presentación en fagos, ribosomas, ADN, células bacterianas o células eucariotas, por ejemplo, células de levadura o de mamífero también se conocen en la técnica, por ejemplo, tales como vectores virales o vectores que codifican proteínas quiméricas.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden referirse no solo a la célula objetivo particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en el presente documento. Las células huésped típicas son procariotas (tales como bacterianas, incluidas, entre otras, *E. coli*) o eucariotas (que incluyen levaduras, células de mamíferos y más). Las células bacterianas son células huésped procariotas preferidas y típicamente son una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) tal como, por ejemplo, la cepa DH5 de *E. coli* disponible a través de Bethesda Research Laboratories, Inc., Bethesda, Maryland. Las células huésped eucariotas preferidas incluyen células de levadura y de mamífero que incluyen células murinas y de roedores, preferiblemente células de vertebrados tales como las de una línea celular de ratón, rata, mono o humano, por ejemplo células HKB11, células PERC.6 o células CHO.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico, es decir, la parte de un antígeno que es reconocida por una molécula de unión, tal como un anticuerpo o un péptido.

Los términos "región de unión", "sitio de unión" y "sitio de interacción" tal como se usan en el presente documento se refieren a un sitio, parte, dominio o tramo particular de residuos de aminoácidos presentes en los polipéptidos de la presente divulgación que es responsable de la unión a una molécula objetivo. Dicha región de unión consiste en residuos de aminoácidos específicos de dicho polipéptido que están en contacto con la molécula objetivo.

La "presentación en fagos" es una técnica mediante la cual los polipéptidos variantes se presentan como proteínas de fusión a una proteína de recubrimiento en la superficie del fago, por ejemplo, partículas de fagos filamentosos, mientras que el material genético que codifica cada variante reside en el interior. Esto crea un enlace físico entre cada secuencia de proteína variante y el ADN que la codifica, lo que permite una división rápida basada en la afinidad de unión a una molécula objetivo dada (anticuerpos, enzimas, receptores de la superficie celular, etc.) mediante un proceso de selección *in vitro* llamado paneo. En su forma más simple, el paneo se lleva a cabo incubando una biblioteca de péptidos presentados en fagos en una placa (o perla) recubierta con el objetivo, lavando el fago no unido y eluyendo el fago específicamente unido. Los fagos eluidos se amplifican y se toman a través de ciclos adicionales de unión/amplificación para enriquecer el conjunto a favor de las secuencias de unión. Después de algunas rondas, los clones individuales se caracterizan por secuenciación de ADN y ELISA.

Una utilidad de la presentación en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorizadas pueden clasificarse rápida y eficientemente para aquellas secuencias que se unen a una molécula objetivo con presentación de alta afinidad de bibliotecas de péptidos y de proteínas en fagos que se han utilizado para la detección de millones de polipéptidos para aquellos con propiedades de unión específica. Los procedimientos de presentación en fagos polivalentes se han utilizado para presentación de péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas mediante fusiones al gen III o al gen VIII del fago filamentosos (Wells y Lowman ((1992) Curr Opin Struct Biol B 355-362) y las referencias citadas allí). En la presentación en fagos monovalentes, una biblioteca de proteínas o péptidos se une a un gen III o una porción del mismo y se expresa a niveles bajos en presencia de la proteína del gen III de tipo silvestre, de modo que las partículas de fago presenten una copia o ninguna de las proteínas de fusión.

El término "vector de fago" significa una forma replicativa bicatenaria de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicarse. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación de fagos y la formación de partículas de fagos. El fago es preferiblemente un bacteriófago filamentosos, tal como un fago M13, fd o un derivado del mismo, un fago lambda, tal como lambda, un baculovirus, un fago T4, un virus del fago T7 o un derivado de cualquiera de los anteriores.

El término "proteína de recubrimiento" significa una proteína, al menos una porción de la cual está presente en la superficie de la partícula del virus. Desde una perspectiva funcional, una proteína de recubrimiento es cualquier proteína que se asocia con una partícula viral durante el proceso de ensamblaje viral en una célula huésped y permanece asociada con el virus ensamblado hasta que infecta a otra célula huésped. La proteína de recubrimiento puede ser la proteína de recubrimiento principal, tal como pVIII, o puede ser una proteína de recubrimiento menor, tal como pIII.

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro que interactúan con un antígeno. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico. El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados y anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. Tanto las cadenas ligera como pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional.

La frase "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más porciones de un anticuerpo que retienen la capacidad de interactuar específicamente (por ejemplo, mediante unión, impedimento estérico, estabilización de la distribución espacial) con un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1;

un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante procedimientos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite formarse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar incluidos dentro del término "fragmento de anticuerpo". Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23: 1126-1136). Los fragmentos de anticuerpos pueden injertarse en armazones basados en polipéptidos tales como Fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de los Estados Unidos No. 6.703.199, que describe monocuerpos de polipéptidos de fibronectina). Los fragmentos de anticuerpos pueden incorporarse en moléculas que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de sitios de unión al antígeno (Zapata et al., (1995) Protein Eng. 8: 1057-1062; y la patente de Estados Unidos No. 5.641.870).

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona nuevas bibliotecas de polipéptidos que están limitadas conformacionalmente en una disposición antiparalela, hélice-giro-hélice (HTH). La presente divulgación se refiere además a procedimientos para generar y seleccionar tales bibliotecas para identificar polipéptidos para usos biológicos, farmacéuticos y de otro tipo.

La biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación se puede usar para el cribado y/o selección de uno o más polipéptidos que se unen específicamente a una molécula objetivo de interés.

Se ha encontrado que los polipéptidos aislados de la biblioteca tienen ciertas propiedades preferidas y son superiores a otros agentes de unión conocidos en la técnica. Dichas propiedades incluyen la unión a objetivos con altas afinidades, un tamaño compacto y pequeño (~6 kDa), baja inmunogenicidad, estabilidad extrema contra la desnaturación térmica y química e insensibilidad a los cambios de pH y a la degradación proteolítica.

Diseño de la biblioteca

Para diseñar una estructura de armazón adecuada para una presentación estructuralmente restringida de las diversas combinaciones de secuencias, se usó un enfoque novedoso y único para combinar las propensiones estadísticas y estructurales de aminoácidos que se producen en las hélices α naturales.

Los residuos de aminoácidos más abundantes encontrados en las hélices α naturales pueden tener propiedades biofísicas favorables que conducen a un desarrollo más eficiente y aumentan la seguridad y eficacia de los polipéptidos resultantes en pacientes. Dichas propiedades biofísicas favorables incluyen alta velocidad de presentación relativa, altos rendimientos de expresión, baja inmunogenicidad, resistencia contra la temperatura y desnaturación química, insensibilidad relativa para alteraciones del pH, estabilidad en suero y resistencia contra la degradación proteolítica por proteasas.

Los datos sobre la abundancia de aminoácidos naturales en las hélices α se pueden obtener de la literatura disponible públicamente, tal como Aurora et al., (Protein Science (1998), 7: 21-38) y Pace et al., (Biophysical Journal (1998), vol. 75, 422-427). Estos datos pueden compilarse para catalogar las preferencias de aminoácidos en ciertas posiciones de la estructura superenrollada de hélice α en una solución acuosa. Con este enfoque, se puede generar una plantilla de diseño, por ejemplo, una plantilla de diseño para una secuencia de referencia hélice α que consta de 15 residuos de aminoácidos, que consta de dos secuencias heptad consecutivas.

Para cada una de dichas 15 posiciones de residuos de aminoácidos, los cinco a seis residuos de aminoácidos más frecuentes se consideran como una base para diseñar dos secuencias de péptidos de hélice α independientes, llamadas Hélice-1 y Hélice-2, respectivamente.

Para seleccionar la secuencia de referencia óptima para la generación de una biblioteca de polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación, se tuvo en cuenta la consideración estructural adicional para promover la formación de hélices y estabilizar la estructura superenrollada de hélice α para seleccionar el residuo amino más apropiado en cada posición.

Por consiguiente, se diseñó una secuencia de polipéptidos de referencia (HTHdes2) que comprende dos péptidos de hélice α y un segmento enlazador. Las pruebas a través de espectros de dicroísmo circular (CD) confirmaron que la

secuencia de referencia HTHdes2 dio como resultado un alto grado de contenido de hélice α y un bajo contenido de estructuras superenrollada aleatorias en solución. Estudios adicionales revelaron que la secuencia HTHdes2 es extremadamente resistente a la desnaturalización térmica y química.

5 La biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación se basa en una estructura de armazón de hélice-giro-hélice (HTH) que comprende dos péptidos de hélice α que están orientados en una disposición antiparalela, de modo que dichos péptidos de hélice α son capaces de formar una estructura de hélice superenrollada estabilizada. Los dos péptidos de hélice α que constituyen el armazón de HTH de la presente divulgación se denominan en este documento Hélice-1 y Hélice-2.

10 En consecuencia, Hélice-1 y Hélice-2 se ensamblan en un armazón de hélice-giro-hélice en una configuración antiparalela, en la que las dos hélices están dispuestas de manera que el extremo terminal amino de Hélice-1 esté alineado con el extremo terminal carboxilo de Hélice-2.

15 En ciertas realizaciones de la divulgación, los dos péptidos de hélice α , Hélice-1 y Hélice-2, tienen un tamaño similar, cada uno con una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos. En otra realización, Hélice-1 y Hélice-2 son de igual longitud. En otra realización, Hélice-1 y Hélice-2 son residuos de 15 aminoácidos de longitud.

20 El ensamblaje de Hélice-1 y Hélice-2 se produce debido a la presencia de un motivo heptad repetido de residuos de aminoácidos conservados.

25 En una realización preferida de la presente divulgación, Hélice-1 y Hélice-2 están formadas por un único polipéptido en el que los dos péptidos de hélice α están directamente unidos mediante un enlace peptídico único entre sí, o están unidos por un segmento enlazador que no interfiere sustancialmente con la asociación de Hélice-1 y Hélice-2 en una estructura de hélice superenrollada.

30 En una realización de la presente divulgación, los dos péptidos de hélice α están unidos covalentemente por un enlazador flexible (Li) de manera que el terminal carboxilo del primer péptido de hélice α (Hélice-1) está unido al terminal amino del segundo péptido de hélice α (Hélice-2).

Por lo tanto, de acuerdo con una realización específica de la presente divulgación, la estructura de armazón de HTH de la biblioteca de la presente divulgación comprende la fórmula general Hélice-1 - Li - Hélice-2.

35 Cada una de las estructuras de armazón que forman péptidos de hélice α está compuesta por un péptido cuya secuencia contiene posiciones "invariantes", es decir, posiciones que contienen los mismos residuos de aminoácidos en cada miembro de la biblioteca, y posiciones "variables", es decir, posiciones que contienen diferentes residuos de aminoácidos en los diferentes miembros de la biblioteca. Estas posiciones variables son importantes para diversificar la biblioteca, es decir, para generar una biblioteca que consta de diferentes miembros.

40 En una realización de la presente divulgación, la variación de la secuencia introducida o las posiciones variables dentro de la biblioteca está presente en ambos péptidos de hélice α , que forman el armazón de HTH de la presente divulgación.

45 En una realización de la presente divulgación, Hélice-1 y Hélice-2 pueden tener los mismos residuos de aminoácidos en sus posiciones invariantes.

En otra realización de la presente divulgación, Hélice-1 y Hélice-2 tienen residuos de aminoácidos diferentes en sus posiciones invariantes.

50 En realizaciones particulares de la presente divulgación, las posiciones invariantes de Hélice-1 y Hélice-2 no corresponden a una secuencia de proteína natural. En otra realización de la presente divulgación, las posiciones invariantes de Hélice-1 y Hélice-2 son de origen no natural. En otra realización de la presente divulgación, las posiciones invariantes de Hélice-1 y Hélice-2 son secuencias artificiales.

55 En un aspecto de la presente divulgación, los residuos de aminoácidos presentes en las posiciones invariantes de Hélice-1 y Hélice-2 se denominan X1, X2, X3, X4, X5 y Hy, respectivamente (véase la Figura 1)

60 Los residuos de aminoácidos invariantes X1, X2, X3, X4 y X5 están expuestos al disolvente ya que están ubicados en el lado exterior del armazón de HTH, y están en contacto con el disolvente cuando la estructura del armazón de HTH está en solución.

65 En una realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X1 se selecciona del grupo de D, T, N, S y P. En otra realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X1 es D en la Hélice-1 y D en la Hélice-2.

- En una realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X2 se selecciona del grupo de E, P, Q, W y D. En otra realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X2 es E en la Hélice-1 y E en la Hélice-2.
- 5 En una realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X3 se selecciona del grupo de M, A, I, Q y R. En otra realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X3 es Q en la Hélice-1 y A en la Hélice-2.
- 10 En una realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X4 se selecciona del grupo de A, L, R, M, K y E. En otra realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X4 es E en la Hélice-1 y K en la Hélice-2.
- 15 En una realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X5 se selecciona del grupo de M, L, A, W, F y K. En otra realización de la presente divulgación, el residuo de aminoácido invariante X5 es K en la Hélice-1 y M en la Hélice-2.
- 20 Los residuos de aminoácidos que varían en la biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación y que contribuyen a la diversidad se denominan Var1, Var2 y Var3. Esto corresponde a las posiciones heptad b, e y f de los péptidos de hélice α Hélice-1 y Hélice-2.
- 25 Hélice-1 y Hélice-2 se unen reversiblemente entre sí de una manera determinada por la identidad de los residuos en las posiciones invariantes de los dos péptidos de hélice α Hélice-1 y Hélice-2.
- Hélice-1 y Hélice-2 de la presente divulgación se componen cada una de dos "heptads" y, por lo tanto, pueden denominarse "repeticiones de heptad". Las repeticiones de heptad dan lugar a posiciones heptad que se repiten regularmente, correspondientes a residuos de aminoácidos que se repiten regularmente a lo largo de la hélice α (Figuras 1 y 3).
- 30 Las orientaciones relativas de las posiciones 'a-g' de las dos hélices α interactuantes dispuestas en una configuración antiparalela de la presente divulgación se muestran en las Figuras 1 y 3.
- 35 En un aspecto de la presente divulgación, el armazón de HTH se estabiliza principalmente por enlaces no covalentes. En realizaciones preferidas, dichos enlaces no covalentes están formados por interacciones hidrófobas entre residuos hidrófobos en la región de contacto entre Hélice-1 y Hélice-2.
- En consecuencia, los péptidos individuales de hélice α Hélice-1 y Hélice-2 se ponen en contacto entre sí a lo largo de sus respectivas caras hidrófobas, formadas por los residuos de aminoácidos que se repiten regularmente Hy. Esto corresponde a las posiciones heptad 'a' y 'd'.
- 40 La región de contacto de Hélice-1 y Hélice-2 comprende el núcleo hidrófobo del armazón de hélice-giro-hélice de la presente divulgación. En un aspecto, dichos residuos de aminoácidos hidrófobos son residuos de aminoácidos invariantes.
- 45 La selección apropiada de los residuos hidrófobos Hy en las posiciones heptad 'a' y 'd' es importante para la formación de una estructura de hélice superenrollada.
- 50 En una realización de la presente divulgación, dichos aminoácidos hidrófobos tienen una hidrofobicidad mayor de 0,62 de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg et al., (1984, J. Mol. Biol. 179: 125-142).
- 55 En una realización de la presente divulgación, Hy es un aminoácido hidrófobo seleccionado del grupo, tal como I, F, V, L, W, M. En otra realización de la presente divulgación, Hy se selecciona del grupo de I, L y V. En otra realización más de la presente divulgación, el aminoácido hidrófobo Hy es L.
- 60 En realizaciones adicionales, el armazón de HTH de la presente divulgación puede estabilizarse adicionalmente mediante la introducción de residuos de aminoácidos cargados negativamente en el extremo terminal amino de cada péptido de hélice α . Esto puede estabilizar el momento dipolar de las hélices α de dichos péptidos. Tal residuo de aminoácido cargado negativamente puede ser D o E. En otra realización, dicho residuo de aminoácido cargado negativamente es D.
- 65 En realizaciones adicionales, el armazón de HTH de la presente divulgación puede estabilizarse adicionalmente por interacciones electrostáticas entre hélices o dentro de las hélices. Tales interacciones electrostáticas pueden ser interacciones iónicas.
- En realizaciones adicionales, el armazón de HTH de la presente divulgación se estabiliza por interacciones iónicas dentro de las hélices entre los residuos de aminoácidos invariantes

X2 de Hélice-1 y X4 de Hélice-2,

X4 de Hélice-1 y X4 de Hélice-2, y/o

X5 de Hélice-1 y X2 de Helix 2.

Preferiblemente, X2 y X4 de Hélice-1 son residuos de aminoácidos cargados negativamente y X5 es un residuo de aminoácidos cargado positivamente. El residuo de aminoácido cargado negativamente puede ser D o E, el residuo de aminoácido cargado positivamente puede ser K, H o R.

Preferentemente, X2 de Hélice-2 es un residuo de aminoácido cargado negativamente y X4 de Hélice-2 es un residuo de aminoácido cargado positivamente.

En realizaciones adicionales, el armazón de HTH de la presente divulgación se estabiliza por interacciones iónicas entre hélices entre los residuos de aminoácidos invariantes X4 y X5 de Hélice-1. Preferiblemente, X4 es un residuo de aminoácido cargado negativamente y X5 es un residuo de aminoácido cargado positivamente. En otra realización, X4 es E y X5 es K.

En realizaciones adicionales, el armazón de HTH de la presente divulgación se estabiliza por enlace de hidrógeno entre hélices.

En una realización, dicho enlace de hidrógeno entre hélices está entre los residuos de aminoácidos invariantes X2 y X3 y/o entre X3 y X4 de Hélice-1. En otra realización, X2 es E, X3 es Q y X4 es E.

Enlazador

Los dos péptidos de hélice α (Hélice-1 y Hélice-2) de la presente divulgación están unidos mediante un enlazador peptídico (Li) que conecta el terminal carboxilo de Hélice-1 con el terminal amino de Hélice-2 dando como resultado una secuencia de aminoácidos de cadena sencilla para los polipéptidos de la divulgación.

En una realización, Hélice-1, Li y Hélice-2 están unidos covalentemente de manera que el terminal carboxilo de Hélice-1 está unido al terminal amino de Li y que el terminal carboxilo de Li está unido al terminal amino de Hélice-2. En otra realización, la disposición desde el terminal amino al carboxilo es la siguiente: Hélice-1, Li y Hélice-2. Una estructura típica de Hélice 1 - enlazador - Hélice 2 de acuerdo con la presente divulgación se representa en las Figuras 1 y 3.

Preferiblemente, el enlazador comprende una región no helicoidal. El primer y último residuo de la región no helicoidal puede ser cualquier aminoácido. Preferiblemente, uno o ambos residuos son residuos de rompimiento de la hélice o desestabilización de la hélice, tales como glicina o prolina.

Dichos enlazadores peptídicos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, enlazadores de glicina, enlazadores de serina, enlazadores mixtos de glicina/serina, enlazadores ricos en glicina y serina, que son conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización de la presente divulgación, el enlazador está ausente.

En una realización de la presente divulgación, el enlazador tiene una longitud de 1 a 50 residuos de aminoácidos. En otra realización, el enlazador tiene una longitud de 1-30 residuos de aminoácidos. Aún en otra realización, el enlazador tiene una longitud de 1-10 residuos de aminoácidos. En una realización, el enlazador tiene una longitud de 5 aminoácidos. En una realización, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos QGVDS (SEQ ID NO: 6). En una realización, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos QGVDS (SEQ ID NO: 6).

Variabilidad de la biblioteca

En general, un motivo de hélice superenrollada es tolerante a las sustituciones de aminoácidos siempre que la hélice α no esté sustancialmente desestabilizada.

La biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación se caracteriza por posiciones diversificadas definidas en las que se colocan mezclas de residuos de aminoácidos. Las posiciones diversificadas dentro de la biblioteca están presentes en ambos péptidos de hélice α (Hélice-1 y Hélice-2) formando la estructura de armazón de HTH de la presente divulgación.

En una realización, 6 posiciones en la Hélice-1 y 6 posiciones en la Hélice-2 están diversificadas.

Por consiguiente, las variaciones de aminoácidos en las posiciones variables del armazón de HTH de la presente divulgación dan lugar a miembros de polipéptidos con diferentes secuencias.

5 Los residuos de aminoácidos en posiciones variantes se denominan Var1, Var2 y Var3. Esto corresponde a las posiciones heptad 'b', 'e', 'f' dentro de los dos péptidos de hélice α del armazón de HTH.

10 Las posiciones diversificadas de residuos de aminoácidos se ubican en una cara de las regiones expuestas al disolvente del armazón de HTH, formando así el sitio de unión predominante en los miembros de polipéptidos de la biblioteca.

10 Como se puede observar en las Figuras 2A y 2B, Var1 representa residuos de aminoácidos expuestos al disolvente que se alinean en el mismo lado del armazón de HTH de la presente divulgación y, por lo tanto, se usaron para la diversificación para generar la biblioteca de la presente divulgación. Véase también el Ejemplo 1.

15 Para aumentar aún más el tamaño de la biblioteca y aumentar la interfase de contacto entre los polipéptidos de la biblioteca y sus moléculas objetivo de interés unidas, se introdujeron posiciones variables adicionales en la Hélice-1 y Hélice-2. Como se indicó anteriormente, los residuos de aminoácidos en las posiciones variantes adicionales de la presente divulgación se denominan Var2 y Var3, respectivamente.

20 La diversificación empleada en la biblioteca de la presente divulgación puede abarcar residuos de aminoácidos tanto naturales como sintéticos.

25 Sin embargo, en ciertas realizaciones, el residuo de aminoácido diversificado Var1, Var2 y Var3 está ocupado exclusivamente por una mezcla de los aminoácidos naturales, como se define en el presente documento.

25 En una realización preferida de la presente divulgación, dicha mezcla es una mezcla igual de los aminoácidos naturales.

30 En otra realización más, el residuo de aminoácido diversificado Var1 comprende una mezcla de aminoácidos naturales que excluyen G, P, C. Se sabe que G, P, C rompen las estructuras de hélice α y, por lo tanto, se evitaron. Además, se excluyó C para evitar la formación de posibles enlaces disulfuro entre dos o más posiciones diversificadas de residuos de aminoácidos. Además, se demostró que los residuos de C parecen ser significativamente menos frecuentes en las hélices α que se producen de forma natural en comparación con otros residuos de aminoácidos de origen natural (Aurora et al., Protein Science (1998), 7: 21-38) y Pace et al., (Biophysical Journal (1998), vol. 75, 422-427)).

40 En una realización de la presente divulgación, las posiciones diversificadas de residuos de aminoácidos Var2 y Var3 comprenden los residuos de aminoácidos naturales E, D, K, R, N, Q y H. En una realización preferida, dicha mezcla es una mezcla igual de dichos residuos de aminoácidos.

40 En una realización, Var2 comprende una mezcla de los residuos de aminoácidos naturales R, E, Q y Var3 comprende una mezcla de los residuos de aminoácidos naturales R, Q, H. En una realización preferida, dicha mezcla es una mezcla igual.

45 Los miembros de la biblioteca de la presente divulgación se caracterizan porque dichos polipéptidos difieren entre sí en el conjunto definido de 12 posiciones diversificadas de residuos de aminoácidos.

50 En consecuencia, los miembros de la biblioteca pueden diferir entre sí en al menos una posición de residuo de aminoácido dentro del conjunto definido de 12 posiciones diversificadas de residuo de aminoácido. Alternativamente, los miembros de la biblioteca pueden diferir entre sí en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o todas las 12, de estas posiciones de residuos de aminoácidos.

55 En consecuencia, los miembros de la biblioteca se pueden distinguir entre sí por la (diferencia o diferencias de secuencias presentes en el conjunto definido de las 12 posiciones diversificadas de residuos de aminoácidos.

60 En ciertas realizaciones, la biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación se muestra en bacteriófagos. Se sabe que la presentación en fagos tiene ventajas significativas al permitir la selección rápida de moléculas útiles. Este procedimiento permite la preparación de bibliotecas tan grandes como 10^{10} miembros de péptidos únicos, muchos órdenes de magnitud más grandes que las bibliotecas que pueden prepararse sintéticamente. El uso de una plataforma tan robusta permite la presentación de bibliotecas grandes y diversas.

65 En ciertas realizaciones, una biblioteca de polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación contiene al menos 10^2 , al menos 10^3 , al menos 10^4 , al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o incluso más miembros diferentes de la biblioteca. En una realización, una biblioteca o colección de polipéptidos de la presente divulgación contiene al menos 10^6 miembros diferentes de la biblioteca.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona una colección de ácidos nucleicos que codifican la biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación.

5 En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un vector que comprende la colección de ácidos nucleicos que codifica la biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones, el vector es un vector de presentación. En otras realizaciones, el vector es un vector de expresión.

10 En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona una célula huésped recombinante que comprende la colección de moléculas de ácido nucleico o el vector que codifica la biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación.

15 En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un procedimiento para aislar un polipéptido específico para un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) poner en contacto la biblioteca de la presente divulgación con un antígeno,

20 b) remover aquellos miembros de la biblioteca que no se unen al antígeno; y

c) recuperar aquellos miembros de la biblioteca unidos al antígeno.

25 En una realización, la presente divulgación proporciona una estructura de armazón de hélice-giro-hélice de la fórmula Hélice-1 - Li - Hélice-2 unida a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en la que Hélice-1 y Hélice-2 comprenden un primer y segundo péptido de hélice α que forman una estructura de hélice superenrollada antiparalela, en la que cada uno de dichos péptidos de hélice α comprende la secuencia de aminoácidos

X1 - X2 - Hy - Var1 -X3 - Hy -Var1 - Var2 - X4 - Hy - Var1 - X5 - Hy - Var1 - Var3 (SEQ ID NO: 1).

30 en la que

X1 es D, T, N, S o P,

35 X2 es E, P, Q, W o D,

X3 es M, A, I, Q o R,

X4 es A, L, R, M, K o E,

40 X5 es M, L, A, W, F o K,

Hy es cualquier residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobicidad mayor que 0,62, y

45 Var1, Var2 y Var3 son mezclas de los aminoácidos naturales, excluyendo G, P y C, y

Li es un enlazador.

50 En un aspecto, la presente divulgación proporciona una biblioteca de polipéptidos, en la que cada miembro de la biblioteca comprende una estructura de armazón de hélice-giro-hélice de la fórmula Hélice-1 - Li - Hélice-2, en la que

Hélice-1 y Hélice-2 comprenden un primer y segundo péptido de hélice α , en el que cada uno de dichos péptidos de hélice α comprende la secuencia de aminoácidos

55 X1 - X2 - Hy - Var1 -X3 - Hy -Var1 - Var2 - X4 - Hy - Var1 - X5 - Hy - Var1 - Var3 (SEQ ID NO: 1),

en la que

60 X1 es D, T, N, S o P,

X2 es E, P, Q, W o D,

X3 es M, A, I, Q o R,

65 X4 es A, L, R, M, K o E,

X5 es M, L, A, W, F o K,

Hy es cualquier residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobicidad mayor que 0,62, y

Var1, Var2 y Var3 son mezclas de los aminoácidos naturales, excluyendo G, P y C,

Li es un enlazador, y

dicho primer y segundo péptido de hélice α forman una estructura de hélice superenrollada antiparalela.

En una realización de la presente divulgación, se añaden residuos de aminoácidos adicionales en el terminal amino y/o el terminal carboxilo del armazón de hélice-giro-hélice.

Los residuos de aminoácidos también se pueden reemplazar, eliminar o agregar, por ejemplo, para ayudar en la expresión de los miembros de la biblioteca en una especie huésped preferida, para facilitar la clonación de la molécula, para aumentar la estabilidad del péptido; para aumentar el empaquetamiento de la hélice, etc. En una realización de la presente divulgación, G se introduce en el terminal amino y carboxilo del armazón de hélice-giro-hélice.

Procedimientos para generar bibliotecas de genes diversificadas

Se conocen numerosos procedimientos para la generación de genes diversificados y bibliotecas de genes. Esto incluye la tecnología Slonomics (documento US12/414,174 y Van den Brulle et al., *Biotechniques* (2008), 45, 340-343)).

La tecnología Slonomics utiliza un número definido de bloques de construcción estandarizados que contienen regiones autocomplementarias. Se utilizan dos clases diferentes de bloques de construcción (llamados "splinkers" y "anclas") para construir sucesivamente bibliotecas de nucleótidos a hechas a la medida con cualquier sesgo deseado.

La tecnología diversificada de oligonucleótidos que contienen trinucleótidos (TRIM) (documento WO93/21203), así como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (Zoller et al., ((1987) *Nucleic Acids. Res.* 10 6487-6504)) son procedimientos adicionales para preparar bibliotecas de genes diversificadas.

La mutagénesis de casete es un procedimiento adicional para preparar las bibliotecas de genes diversificadas. El procedimiento se basa en el descrito por Wells et al., ((1985) *Gene* 34: 315).

Las bibliotecas de genes diversificadas también se pueden preparar mediante síntesis de péptidos en fase sólida estándar (Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85 (14), páginas 2149-2154) con la mezcla posterior de los productos purificados.

En ciertas realizaciones, la síntesis de la biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación implica la etapa de producir una biblioteca de ácidos nucleicos o vectores de al menos 100 miembros, en la que cada miembro codifica un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación, y en la que los diferentes miembros de la biblioteca codificada difieren entre sí en al menos uno de un conjunto definido de 12 posiciones diversificadas de residuos de aminoácidos.

Tras la expresión en células huésped, se obtiene la biblioteca de polipéptidos de la presente divulgación. Estas etapas se pueden lograr de diferentes maneras, como sabrá el experto en la materia. En general, tales etapas incluyen típicamente transformar o transfectar una célula huésped adecuada con una biblioteca de ácidos nucleicos o vectores o una partícula infecciosa que codifica la biblioteca de polipéptidos. Además, tales etapas incluyen típicamente cultivar dichas células huésped en condiciones adecuadas para la proliferación (multiplicación, crecimiento) de dichas células huésped y una etapa de cultivo en condiciones adecuadas para la producción (expresión, síntesis) de los polipéptidos codificados. El cultivo de células huésped en condiciones adecuadas para la proliferación o expresión se lleva a cabo típicamente en presencia de medios que comprenden componentes adecuados para el crecimiento celular o la inducción de la expresión. En realizaciones particulares, los procedimientos para la producción de bibliotecas de polipéptidos de la presente divulgación comprenden además la etapa de aislar el polipéptido producido de las células huésped o el medio. Se observa además que las bibliotecas de polipéptidos expresados pueden, además de los polipéptidos de secuencia diferente, contener también múltiples copias de polipéptidos idénticos.

Procedimientos de presentación en fagos

Los procedimientos de presentación en fagos para proteínas, péptidos y variantes mutadas de los mismos, que incluyen la construcción de una familia de vectores replicables variantes que contienen un elemento regulador de la

transcripción operativamente unido a una fusión génica que codifica un polipéptido de fusión que transforma células huésped adecuadas, el cultivo de las células transformadas para formar partículas fagos que presentan el polipéptido de fusión en la superficie de la partícula del fago, poner en contacto las partículas del fago recombinante con una molécula objetivo, de modo que al menos una parte de la partícula se una al objetivo, separar las partículas que se unen de las que no se unen, son conocidos por los expertos en la técnica y puede usarse con las bibliotecas divulgadas en el presente documento.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos a al menos una porción de una proteína de recubrimiento de fago para formar una proteína de fusión que contiene el polipéptido divulgado en este documento. La proteína de fusión puede prepararse expresando una fusión génica que codifica la proteína de fusión usando técnicas conocidas de presentación en fagos. La proteína de fusión puede formar parte de un fago o partícula de fagémido en la que se presentan una o más copias del péptido en la superficie de la partícula.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona vectores que comprenden los genes de fusión mencionados anteriormente, así como una biblioteca de estos vectores. La biblioteca de vectores puede estar en forma de una biblioteca de ADN, una biblioteca de partículas de virus (fago o fagémido) que contiene la biblioteca de genes de fusión o en forma de una biblioteca de células huésped que contiene una biblioteca de vectores de expresión o partículas virales.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un procedimiento que comprende las etapas de preparar una biblioteca que contiene una pluralidad de vectores, comprendiendo cada vector un elemento regulador de la transcripción operativamente unido a una fusión génica que codifica una proteína de fusión, en la que la fusión génica comprende un primer gen que codifica un péptido divulgado en este documento y un segundo gen que codifica al menos una porción de una proteína de recubrimiento de fago, en la que la biblioteca comprende una pluralidad de genes que codifican proteínas de fusión de polipéptidos.

Se puede obtener el gen que codifica la proteína de recubrimiento del fago y el gen que codifica la porción de polipéptido deseada de la proteína de fusión de la presente divulgación (el polipéptido de la presente divulgación unido a al menos una porción de una proteína de recubrimiento del fago) por procedimientos conocidos en la técnica (véase en general, Sambrook et al.). El ADN que codifica el gen puede sintetizarse químicamente (Merrifield (1963) 7 Am Chem Soc 85: 2149).

La proteína de recubrimiento del fago es preferiblemente la proteína de recubrimiento del gen III o del gen VIII de un fago filamentoso, tal como, M13. Puede usarse cualquier vector de gen III adecuado para la presentación de péptidos, incluidos fd-CAT1 (McCafferty et al., (1990) Nature (Londres) 348: 552-554) y pHEN I (Hoogenboom et al., (1991) Nucleic Acids Res 19: 4133 -4137).

Los expertos en la técnica conocen los vectores de fago, los vectores de fagémido y el fago auxiliar adecuados para su uso de acuerdo con la presente divulgación.

Cualquier célula adecuada que pueda transformarse por electroporación puede usarse como célula huésped en el procedimiento de la presente divulgación. Las células huésped adecuadas que pueden transformarse incluyen células bacterianas gram negativas tales como *E. coli*. Las cepas de *E. coli* adecuadas pueden incluir TG1F⁻ o *E. coli* XL-I Blue (Stratagene).

En ciertas realizaciones, la célula huésped para la electroporación es una cepa de *E. coli* competente que contiene un episoma de fago F⁺. Se puede usar cualquier episoma F⁺ que permita la replicación de fagos en la cepa.

Después de la selección de las células transformadas, estas células se hacen crecer en un cultivo y el ADN del vector se puede aislar. El ADN del vector de fago o fagémido puede aislarse y analizarse usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Sambrook et al.

Procedimientos de paneo

Pueden usarse diversos procedimientos de paneo de acuerdo con la presente divulgación. En un protocolo de paneo directo, el objetivo se inmoviliza sobre un soporte sólido. Ejemplos de soporte sólido son placas o tubos de microtitulación (por ejemplo, placas Maxisorp, tubos Maxisorp, Nunc) o perlas magnéticas (Dynabeads, Invitrogen). El objetivo puede recubrirse directamente sobre plástico o perlas (por ejemplo, perlas activadas en la superficie, como Dynabeads), o mediante estreptavidina cuando el objetivo está biotinilado. Se pueden usar otras etiquetas para capturar los objetivos, tales como las etiquetas His o, alternativamente, también se puede usar un anticuerpo dirigido contra el objetivo para capturar el objetivo en el soporte.

También se puede usar el protocolo de paneo en solución. En el presente documento, el objetivo se captura en el soporte sólido después de la incubación con la biblioteca de fagos. La interacción objetivo-fago se realiza en solución. Para poder remover el fago no unido, el objetivo debe inmovilizarse sobre un soporte sólido.

En ciertas realizaciones, se usa un objetivo marcado con Fc, mediante el cual los fagos, que presentan un polipéptido de la presente divulgación que se une al objetivo, se capturan con un soporte recubierto con proteína G o proteína A (por ejemplo, perlas magnéticas).

5 Polipéptidos de la presente divulgación

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden sintetizarse por una variedad de medios, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante o por síntesis química. Los procedimientos de síntesis de péptidos son conocidos en la técnica.

10 Alternativamente, las secuencias de codificación para los polipéptidos pueden ser moléculas de ADN recombinante, que se introducen en vectores de expresión o fago uniendo operativamente el ADN a las regiones de control de expresión necesarias (por ejemplo, regiones reguladoras) requeridas para la expresión génica.

15 Los vectores pueden introducirse en las células huésped apropiadas tales como células procariotas (por ejemplo, bacterianas) o eucariotas (por ejemplo, levadura o de mamífero) mediante procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Current Protocol in Molecular Biology", Ausubel et al., (Eds.), Greene Publishing Assoc. and John Wiley Interscience, Nueva York, 1989 y 1992). Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de clonación, y la selección de un vector de clonación apropiado es una cuestión de elección.

20 El gen se puede colocar bajo el control de un promotor, un sitio de unión al ribosoma (para la expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador (denominado colectivamente en este documento como elementos de "control"), de modo que la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada se transcribe en ARN en la célula huésped transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia de codificación puede
25 contener o no un péptido señal o una secuencia líder.

Dependiendo del sistema de expresión y el huésped seleccionado, las proteínas de la presente divulgación se producen mediante el crecimiento de células huésped transformadas por un vector de expresión descrito
30 anteriormente en condiciones en las que se expresa la proteína de interés.

La proteína se aísla luego de las células huésped y se purifica. Si el sistema de expresión secreta la proteína en el medio de crecimiento, la proteína puede purificarse directamente del medio. Si la proteína no se secreta, se aísla de los lisados celulares o se recupera de la fracción de membrana celular. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas y los procedimientos de recuperación están dentro de la habilidad de la técnica.
35

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden purificarse luego mediante una serie de técnicas tal como conocen los expertos en la materia.

40 Debe observarse que las bibliotecas y los polipéptidos de la divulgación no son proteínas naturales. Típicamente, los polipéptidos de la presente divulgación son secuencias de aminoácidos, polipéptidos o proteínas recombinantes, sintéticos o semisintéticos.

45 Como se describe adicionalmente en el presente documento, el número total de residuos de aminoácidos en un polipéptido de la presente divulgación puede estar en el intervalo de 25 a 50.000, en el intervalo de 25-10.000, en el intervalo de 25 a 5.000, en el intervalo de 25-1.000, en el intervalo de 25-500, en el intervalo de 25-250, en el intervalo de 25-100, en el intervalo de 25-50 o en el intervalo de 25-35, dependiendo principalmente de la longitud de los enlazadores flexibles que interconectan los dos péptidos de hélice α y las fracciones adicionales que pueden estar enlazadas al armazón de hélice-giro-hélice.

50 Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden sintetizar con residuos de aminoácidos adicionales añadidos en sus terminales amino y carboxilo para permitir la unión del extremo terminal amino y carboxilo de los polipéptidos. Los polipéptidos ciclados así formados pueden aumentar aún más la estabilidad de la estructura de hélice α y mejorar la resistencia contra la degradación proteolítica por proteasas.

55 Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ciclarse, introduciendo por ejemplo, un puente disulfuro o un enlace tioéter insensible a la reducción. Se puede formar un enlace disulfuro bajo condiciones oxidantes entre residuos de cisteína introducidos en el terminal amino y carboxilo. Se puede formar un enlace tioéter de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, entre N-cloroacetilglicina presente en el terminal amino y un residuo C presente en el terminal carboxilo.

60 En una realización de la presente divulgación, los polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación son polipéptidos cíclicos.

En una realización de la presente divulgación, los polipéptidos cíclicos están formados por un enlace covalente.

65 En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el enlace covalente es un enlace disulfuro.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el enlace disulfuro está formado por dos residuos C.

5 En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el enlace disulfuro se forma entre un residuo C presente en el extremo terminal amino y un residuo C presente en el extremo terminal carboxilo de los polipéptidos de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el enlace covalente es un enlace tioéter.

10 En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el enlace covalente es un enlace tioéter formado entre N-cloroacetilglicina y un residuo C.

15 En ciertas realizaciones, el enlace covalente es un enlace tioéter formado entre N-cloroacetilglicina presente en el terminal amino y un residuo C presente en el terminal carboxilo de los polipéptidos de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones, el enlace covalente es un enlace tioéter formado entre N-cloroacetilglicina presente en el terminal amino y un residuo C presente en el terminal carboxilo de los polipéptidos de la presente divulgación.

20 Proteínas de fusión de polipéptidos

Los polipéptidos proporcionados por la biblioteca de la presente divulgación pueden o no estar unidos a una o más fracciones adicionales.

25 Dichas proteínas de fusión se pueden preparar de cualquier manera adecuada, incluyendo enfoques genéticos o químicos.

30 Dichas fracciones unidas pueden contener secuencias secretoras o líderes, secuencias que ayudan a la detección, expresión, separación o purificación, o secuencias que confieren un aumento de la estabilidad de la proteína, por ejemplo, durante la producción recombinante.

35 Los ejemplos de fracciones potenciales incluyen beta-galactosidasa, glutatión-S-transferasa, luciferasa, un fragmento de polimerasa T7, un péptido señal de secreción, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, una toxina, una enzima informadora, una fracción capaz de unirse a un ión metálico tal como una etiqueta de polihistidina, una etiqueta adecuada para detección y/o purificación, un dominio de homo o hetero asociación, una fracción que aumenta la solubilidad de una proteína o una fracción que comprende un sitio de escisión enzimática. Por consiguiente, un polipéptido de la divulgación puede contener opcionalmente una o más fracciones para unirse a otros objetivos o proteínas objetivo de interés.

40 Debe quedar claro que tales fracciones adicionales pueden o no proporcionar funcionalidad adicional a los polipéptidos de la divulgación y pueden o no modificar las propiedades del polipéptido de la divulgación.

45 Los polipéptidos de la presente divulgación pueden estar unidos a uno o más fracciones adicionales directamente por un enlace peptídico sencillo o a través de uno o más espaciadores que contienen uno o más residuos de aminoácidos.

El espaciador o espaciadores adecuados para usar en la unión de los polipéptidos de la divulgación con una o más fracciones pueden ser cualquier región espaciadora usada en la técnica para unir péptidos y/o proteínas.

50 Algunos espaciadores adecuados incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a espaciadores de polipéptidos tales como espaciadores de glicina, espaciadores de serina, espaciadores mixtos de glicina/serina, espaciadores ricos en glicina y serina, espaciador compuesto de fragmentos de polipéptidos en gran parte polares o espaciadores que comprenden una secuencia de aminoácidos que forma una conformación de hélice aleatoria.

55 Un espaciador puede ser cualquier secuencia de aminoácidos adecuada que tenga una longitud entre 1 y 500 residuos de aminoácidos, tal como entre 1 y 100, entre 1 y 50, entre 1 y 10, o entre 1 y 5 residuos de aminoácidos.

60 En una realización, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos a una etiqueta de polihistidina. En otra realización, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos a una etiqueta FLAG. Aún en otra realización, los polipéptidos están unidos a una etiqueta FLAG y polihistidina. En ciertas realizaciones, dicha etiqueta de polihistidina y/o FLAG está unida al terminal carboxilo y/o amino del polipéptido de la presente divulgación.

65 En otra realización, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos a una proteína de unión a maltosa (MBP). La proteína de unión a maltosa puede aumentar la solubilidad durante la expresión en huéspedes bacterianos. En ciertas realizaciones, el dominio de la proteína de unión a maltosa está unido al terminal amino del polipéptido.

En ciertas realizaciones, el huésped bacteriano usado para la expresión es *Escherichia coli*.

5 En otra realización, un lado de escisión enzimática está presente entre el terminal carboxilo del dominio de unión a maltosa y el terminal amino de los polipéptidos de la presente divulgación. En ciertas realizaciones, dicho lado de escisión enzimática es un lado de escisión FXa.

10 En realizaciones adicionales, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo. En ciertas realizaciones, dicho fragmento de anticuerpo comprende un fragmento Fab.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo puede tener la misma especificidad de unión o una especificidad de unión diferente que los polipéptidos de la presente divulgación.

15 Los polipéptidos de la presente divulgación pueden estar unidos al anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo del mismo, ya sea por un enlace directo al terminal amino y/o carboxilo de los polipéptidos o por una región espaciadora que comprende uno o más residuos de aminoácidos en el terminal amino y/o carboxilo de los polipéptidos.

20 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos al terminal carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo. Véase la Figura 9A.

En otras realizaciones, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos al terminal carboxilo de la cadena ligera de un anticuerpo. Véase la Figura 9B.

25 En otras realizaciones, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos al terminal carboxilo de un fragmento Fab de anticuerpo de cadena pesada. Véase la Figura 9C.

En otras realizaciones, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos al terminal carboxilo de un fragmento Fc de anticuerpo (CH2-CH3). Véase la Figura 9D.

30 En otras realizaciones, los polipéptidos de la presente divulgación están unidos al terminal amino de un fragmento Fc de anticuerpo (CH2-CH3). Véase la Figura 9E.

35 En una realización, la presente divulgación proporciona una estructura de almacén de hélice-giro-hélice unida a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en el que dicha estructura de almacén de hélice-giro-hélice comprende un primer y un segundo péptido de hélice α que forman una estructura de hélice superenrollada antiparalela.

40 En una realización, la presente divulgación proporciona una estructura de almacén de hélice-giro-hélice unida al terminal carboxilo de las cadenas pesadas de un anticuerpo, en el que dicha estructura de almacén de hélice-giro-hélice comprende un primer y un segundo péptido de hélice α que forma una estructura de hélice superenrollada antiparalela.

45 En una realización, la presente divulgación proporciona una estructura de almacén de hélice-giro-hélice unida al terminal carboxilo de las cadenas ligeras de un anticuerpo, en el que dicha estructura de almacén de hélice-giro-hélice comprende un primer y un segundo péptido de hélice α que forma una estructura de hélice superenrollada antiparalela.

50 En una realización, la presente divulgación proporciona una estructura de almacén de hélice-giro-hélice unida al terminal carboxilo de la cadena pesada de un fragmento Fab de anticuerpo, en el que dicha estructura de almacén de hélice-giro-hélice comprende un primer y un segundo péptido de hélice α que forma una estructura de hélice superenrollada antiparalela.

55 En una realización, la presente divulgación proporciona una estructura de almacén de hélice-giro-hélice unida al terminal amino de un fragmento de anticuerpo Fc, en el que dicha estructura de almacén de hélice-giro-hélice comprende un primer y un segundo péptido de hélice α que forma una estructura de hélice superenrollada antiparalela.

60 En una realización, la presente divulgación proporciona una estructura de almacén de hélice-giro-hélice unida al terminal carboxilo de un fragmento de anticuerpo Fc, en el que dicha estructura de almacén de hélice-giro-hélice comprende un primer y un segundo péptido de hélice α que forman una estructura de hélice superenrollada antiparalela.

Funcionalidad

65 Los polipéptidos de la presente divulgación pueden usarse para la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos que están mediados por la ruta o rutas biológicas en las que está involucrada la molécula objetivo de interés, contra la cual se dirigen los polipéptidos.

Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden usar para prevenir o inhibir la interacción entre una o más moléculas objetivo de interés y sus correspondientes receptores o compañeros de unión naturales, evitando, inhibiendo o reduciendo por lo tanto las rutas de señalización mediadas por aquellas moléculas objetivo de interés y/o modulando las vías y mecanismos biológicos en los que están involucradas esas moléculas objetivo de interés.

Los procedimientos para analizar la actividad funcional pueden utilizar ensayos de unión, tales como el ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y otros procedimientos que son bien conocidos en la técnica (véase Hampton, R. et al., (1990; Serological Methods a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN) y Maddox, DE et al., (1983; J. Exp. Med. 158: 1211-1216). Alternativamente, existen ensayos que puede probar la capacidad del péptido mimético para provocar una respuesta biológica como resultado de la unión a un objetivo biológico, *in vivo* o *in vitro*. Tales ensayos incluyen ensayos de proliferación de células B y células T, y ensayos de inhibición de la proliferación (véase Paul et al., (1991). Los expertos en la materia conocerán otros ensayos adecuados.

Composiciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más polipéptidos obtenibles por los procedimientos de la presente divulgación y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable denominado en el presente documento como composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además al menos otro compuesto farmacéuticamente activo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden usar en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con una molécula objetivo de interés.

En particular, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación que son adecuados para uso profiláctico, terapéutico y/o de diagnóstico en un animal de sangre caliente, y en particular en un mamífero, y más en particular en un ser humano.

En general, los polipéptidos de la presente divulgación pueden formularse como una preparación farmacéutica o como composiciones que comprenden al menos un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación y al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos. Dicha formulación puede ser adecuada para administración oral, parenteral, tópica o para administración por inhalación.

En particular, los polipéptidos de la presente divulgación pueden usarse en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos que son o pueden usarse para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades y trastornos en los que está implicada una molécula objetivo de interés, como resultado de lo cual se puede obtener o no un efecto sinérgico. Los ejemplos de tales compuestos, así como las rutas, procedimientos y formulaciones farmacéuticas o composiciones para administrarlos serán claros para el profesional clínico.

En una realización, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más polipéptidos de la presente divulgación para uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno o afección asociada con la presencia no deseada de una molécula objetivo de interés específicamente unida por uno o más polipéptidos.

En una realización, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más polipéptidos de la presente divulgación para el uso como un medicamento.

En una realización, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más polipéptidos de la presente divulgación para uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades neovasculares, enfermedades infecciosas, trombosis, infarto de miocardio y/o diabetes.

En una realización adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, cáncer, enfermedades neovasculares, enfermedades infecciosas, trombosis, infarto de miocardio y/o diabetes en un sujeto que lo necesita, usando una composición farmacéutica que comprende uno o más polipéptidos de la presente divulgación.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una tabla de la biblioteca de hélice-giro-hélice HTH-lib1 de la presente divulgación. La Figura 1 divulga las SEQ ID NOS: 1, 7 y 1, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 2A muestra una sección transversal de rueda helicoidal para los dos péptidos de hélice α de la secuencia de referencia de hélice-giro-hélice (HTHdes2) de la presente divulgación. Las posiciones

diversificadas de aminoácidos Var1, Var2 y Var3 dentro de la biblioteca de HTH-lib1 de la presente divulgación se denotan dentro de los círculos exteriores.

5 **La Figura 2B** representa un dibujo tridimensional de la biblioteca de HTH-lib1 hélice-giro-hélice de la presente divulgación, que indica las posiciones de los residuos de aminoácidos variables Var1, Var2 y Var3.

La Figura 2C representa la secuencia de referencia de HTHdes2 con interacciones electrostáticas dentro de la cadena y entre cadenas, así como enlaces de hidrógeno entre cadenas entre distintos residuos de aminoácidos.

10 **La Figura 3** muestra el diseño de la biblioteca de polipéptidos de HTH-lib1 como se divulga en este documento (las SEQ ID NOS: 8-9, respectivamente, en orden de aparición).

15 **La Figura 4** muestra una evaluación de calidad de la biblioteca de polipéptidos de la Figura 3. La Figura 4A muestra la distribución de aminoácidos en posiciones diversificadas de la biblioteca de HTH-lib1 de clones muestreados individualmente usando secuenciación de Sanger. La Figura 4B representa para cada posición diversificada de aminoácidos la distribución de aminoácidos esperada en el contexto de los resultados de secuenciación de la Figura 4A.

20 **La Figura 5** muestra ejemplos de polipéptidos de la biblioteca de HTH-lib1 no seleccionada (las SEQ ID NOS: 8, 9 y 10-41, respectivamente, en orden de aparición). Los ejemplos ilustran que el diseño de la biblioteca se produjo con éxito.

25 **La Figura 6** muestra una vista simplificada de los vectores de visualización y expresión, así como el enfoque basado en PCR para subclonar un inserto que codifica un polipéptido del vector de presentación en el vector de expresión. La Figura 6 divulga "His₆" como la SEQ ID NO: 42.

30 **La Figura 7** muestra ejemplos de resultados de secuenciación derivados de polipéptidos identificados después de una detección por ELISA de clones individuales derivados de una segunda ronda de salida de paneo de la biblioteca de HTH-lib1 de la Figura 3 en Target-X. El resultado confirma que se puede identificar un número diverso de polipéptidos específicos objetivo (las SEQ ID NOS: 43-67, respectivamente, en orden de aparición).

35 **La Figura 8** muestra dos espectros de dicroísmo circular (CD) de un polipéptido específico de Target-X en tampón de fosfato 10 mM a pH 7,2 a 20 °C y una concentración de polipéptido de 0,1 mg/ml tratado a temperaturas de 20 °C y 90 °C.

40 **La Figura 9** muestra dibujos de armazones de HTH como se divulga en el presente documento, unidos a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La Figura 9A representa dos armazones de HTH unidos al terminal carboxilo de las cadenas pesadas de un anticuerpo. La Figura 9B representa dos armazones de HTH unidos al terminal carboxilo de las cadenas ligeras de un anticuerpo. La Figura 9C representa un armazón de HTH unido al terminal carboxilo de la cadena pesada de un fragmento Fab de anticuerpo. La Figura 9D y la Figura 9E representan un armazón de HTH unido al terminal carboxilo o amino de un fragmento Fc de un anticuerpo.

Ejemplos

45 **Ejemplo 1: Diseño de la biblioteca**

El diseño de la biblioteca se basa en un enfoque combinado que tiene en cuenta factores estadísticos, estructurales y racionales.

50 Esto incluye el análisis de los residuos de aminoácidos más abundantes encontrados en estructuras de hélice α naturales. Dichos aminoácidos pueden tener propiedades biofísicas favorables que conducirían a un desarrollo más eficiente y aumentarían la seguridad y eficacia de los polipéptidos resultantes en pacientes. La abundancia de aminoácidos naturales en las hélices α se obtuvo de la literatura, tal como en Aurora et al., (Protein Science (1998), 7: 21-38) y Pace et al., (Biophysical Journal (1998), vol. 75, 422-427). Estos datos se usaron para catalogar las preferencias de residuos en los extremos terminales amino y carboxilo de las hélices α , así como para catalogar las preferencias de residuos que se encuentran más en la región central de las hélices α . Un enfoque particular se centró en aquellos aminoácidos que se producen en posiciones que son relevantes para la formación de la estructura de hélice α superenrollada en solución acuosa.

60 Los datos se transfirieron posteriormente a una plantilla para diseñar secuencias de referencia de hélice α potenciales. Dicha secuencia de referencia tiene una longitud de 15 residuos de aminoácidos y comprende dos secuencias heptad consecutivas. Para cada una de dichas 15 posiciones de residuos de aminoácidos, los cinco a seis residuos de aminoácidos que se presentan con mayor frecuencia se consideraron como una base para diseñar dos secuencias de péptidos de hélice α independientes que pueden desde una estructura de hélice superenrollada orientada en forma antiparalela y estabilizada en solución acuosa.

65

Con el fin de seleccionar la secuencia de referencia óptima para la generación de una biblioteca de polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación, se tuvieron en cuenta consideraciones estructurales adicionales para promover la formación de hélices y estabilizar la estructura de hélice α superenrollada para seleccionar el residuo de aminoácido más apropiado en cada posición.

En consecuencia, una secuencia de polipéptidos de referencia (HTHdes2) que comprende dos péptidos de hélice α y un segmento enlazador como se representa en la Figura 3, se diseñó y seleccionó para la síntesis y prueba del contenido de hélice α mediante mediciones de espectros de dicroísmo circular (CD). Los datos obtenidos confirmaron que la secuencia de referencia HTHdes2 dio como resultado un alto grado de estructura de hélice α y un bajo contenido de estructuras de hélice superenrollada al azar en solución. Estudios adicionales revelaron que la secuencia de HTHdes2 era extremadamente resistente a la desnaturalización térmica y química. Véase también el Ejemplo 12.

Además, una detección de epítomos de células T *in silico* para la secuencia de referencia HTHdes2 (Lonza, la herramienta Epibase^{MR} *In Silico*) reveló un riesgo de inmunogenicidad bajo o nulo para el constructo generado.

La secuencia de referencia HTHdes2 se usó posteriormente para la construcción de la biblioteca de polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación.

En una primera etapa, los inventores tuvieron que decidir qué posiciones de aminoácidos específicas en la secuencia de referencia HTHdes2 deberían usarse para la diversificación sin desestabilizar la estructura secundaria de hélice α de los dos péptidos formadores de HTH y sin comprometer la formación de la estructura de hélice superenrollada.

La estabilización de una estructura de HTH se puede lograr mediante la diversificación de solo uno de los dos péptidos de hélice alfa como ha sido descrito por Fujii et al., (*Biochemistry*, 47, 6745-6751 (2008)). En este escenario, el segundo péptido no diversificado conserva su estructura de hélice α y estabiliza la estructura de hélice-giro-hélice. Sin embargo, la diversificación de un solo péptido limita significativamente el tamaño alcanzable de la biblioteca y reduce la interacción entre los polipéptidos de la biblioteca y sus moléculas objetivo de interés.

Por lo tanto, los inventores decidieron diversificar ambos péptidos de hélice α . Las posiciones variables presentes en ambos péptidos de hélice α contribuyen a una interacción ampliada entre un polipéptido particular y su antígeno objetivo, lo que da como resultado una especificidad y afinidad mejoradas.

Como se describe en el presente documento y como se muestra en las Figuras 1 y 3, las posiciones de aminoácidos, que se seleccionaron principalmente para la diversificación, fueron las posiciones heptad 'b' y 'e' de Hélice-1 y Hélice-2. Dado que cada hélice comprende dos heptads, las posiciones de 4 aminoácidos se diversificaron por hélice. Estas posiciones de aminoácidos, denominadas en este documento Var1, se muestran en la misma orientación paralela relativa y son los residuos clave expuestos al disolvente para interactuar con un antígeno objetivo de interés (Figuras 2A y 2B). Debido a este papel predominante, las posiciones respectivas se diversificaron completamente con 17 aminoácidos de origen natural, dejando de lado solo G, P y C, que se sabe que rompen las estructuras de hélice α .

El ensamblaje de los dos péptidos de hélice α proporciona un total de ocho residuos de aminoácidos diversificados, todos los cuales se muestran en la misma orientación paralela relativa fuera de la estructura de armazón de HTH con un ligero desplazamiento espacial de las posiciones diversificadas dentro de los dos péptidos alineados. En consecuencia, se forma una interfaz de interacción amplia y plana a lo largo de toda la estructura del armazón de HTH, lo que permite una interacción óptima proteína-proteína con un antígeno objetivo de interés.

Para aumentar aún más el tamaño de la biblioteca y la interfaz de interacción, se consideraron residuos de aminoácidos adicionales dentro de la secuencia de referencia HTHdes2 para la diversificación. Los residuos de aminoácidos presentes en las posiciones heptad f también están orientados hacia la interfaz de interacción, aunque no completamente de forma paralela. De acuerdo con la geometría local, la orientación de los residuos en las posiciones heptad f parecen ligeramente anguladas (Figura 1 y Figuras 2A y 2B), pero los residuos aún pueden interactuar con un antígeno objetivo. Por lo tanto, 4 de dichas posiciones heptad f se seleccionaron para una mayor diversificación y se denominaron Var2 y Var3.

Con base en la orientación angulada de los residuos hacia la interfaz de interacción, los aminoácidos con cadenas laterales cargadas o polares tales como E, D, K, R, N, Q y H se consideraron como los residuos óptimos para la diversificación de Var2 y Var3. En este escenario, los grupos funcionales polares o cargados ubicados en los terminales de cada residuo son capaces de interactuar con el disolvente circundante, mientras que la cadena principal carbonada no polar puede interactuar con el antígeno objetivo. La selección final de los 3 residuos de aminoácidos utilizados para la diversificación de Var2 y Var3 fue impulsada por su ocurrencia natural en hélices α en las posiciones correspondientes como lo describen Aurora et al., (*Protein Science* (1998), 7: 21-38) y Pace et al., (*Biophysical Journal* (1998), vol. 75, 422-427). Por lo tanto, se usó una mezcla de residuos de aminoácidos

ligeramente diferente para Var2 y Var3. El tamaño de la biblioteca teórica por lo tanto asciende a $5,6 \times 10^{11}$ miembros de la biblioteca.

5 En resumen, la biblioteca de la presente divulgación se construyó para maximizar el número de posiciones diversificadas sin comprometer las estructuras estabilizadoras de hélice α que forman la estructura de armazón de HTH de la presente divulgación.

Ejemplo 2: Generación de la biblioteca de HTH-lib1

10 Los fragmentos de ADN que contienen la secuencia de la biblioteca de polipéptidos se sintetizaron de la siguiente manera: las regiones constantes flanqueantes que comprenden una secuencia señal, etiqueta de epítipo y regiones espaciadoras se sintetizaron por síntesis génica. La biblioteca de polipéptidos que codifica la secuencia de polipéptidos con 12 posiciones diversificadas de aminoácidos se sintetizó con la tecnología Slonomics. Los
15 fragmentos resultantes de ADN lineal sintético de 279 pb que comprenden la biblioteca de polipéptidos y las regiones constantes flanqueantes se clonaron en el vector de presentación pPEPdisC3fl_HTH-lib1 (como se describe en el documento WO2015166036 con modificaciones menores).

Ejemplo 3: Determinación de la velocidad de presentación

20 La presentación de polipéptidos en el fago producido se evaluó mediante transferencia Western. Después de la separación por SDS-PAGE, las proteínas se detectaron usando un anticuerpo contra el epítipo FLAG (M2, Sigma-Aldrich) ya que esta etiqueta de epítipo está codificada por la biblioteca de polipéptidos pIII (fl) y, por lo tanto, parte de los péptidos presentados. Para la detección de pIII total, se usó un anticuerpo anti-pIII (MiBiTec). Los fagos
25 auxiliares presentaron aproximadamente 2-3 péptidos de biblioteca por fago y en hiperfagos todas las 5 copias de pIII portan los péptidos de la biblioteca.

Además, la visualización de polipéptidos en el fago producido se evaluó cualitativamente mediante ELISA, utilizando un anticuerpo anti-M13 (GE Healthcare) para la captura de fagos y dos anticuerpos para detección específica. Un
30 anticuerpo anti-M13 monoclonal conjugado con HRP (Amersham) y un anticuerpo monoclonal contra el epítipo FLAG conjugado con AP (Sigma).

Los resultados confirmaron una alta tasa de presentación de polipéptidos de biblioteca.

Ejemplo 4: Control de calidad

35 Otro aspecto importante es la evaluación de la calidad y funcionalidad de la biblioteca de polipéptidos HTH-lib1. Se realizó una evaluación cualitativa de la biblioteca de fagos, con respecto a la distribución de aminoácidos, la frecuencia y la redundancia utilizando la secuenciación de Sanger.

40 Se analizaron 175 clones del diseño de la biblioteca que se muestra en la Figura 3 usando secuenciación de Sanger. Los resultados de la secuenciación se muestran en la Figura 4A. La Figura 4A muestra la posición y distribución de los aminoácidos indicados en posiciones diversificadas en la Hélice-1 y Hélice-2, respectivamente.

45 De los 175 clones individuales muestreados, se identificó una distribución bien equilibrada de los aminoácidos naturales excepto G, P y C para Var1. De manera similar, se pudo confirmar una distribución bien equilibrada de los aminoácidos R, Q y E para Var2 y de los aminoácidos R, Q y H para Var3.

50 La Figura 4B muestra la distribución de aminoácidos esperada en comparación con los resultados de secuenciación (dados en porcentaje). Estos resultados demuestran que la composición de la biblioteca sintetizada es esencialmente idéntica al diseño de la biblioteca.

Ejemplo 5: Paneos y detecciones

55 La idoneidad de la biblioteca de polipéptidos HTH-lib1 divulgada en el presente documento para la identificación de péptidos terapéuticos potenciales se analizó usando antígenos modelo disponibles.

[La biblioteca HTH-lib1 se usó para las selecciones de prueba contra el modelo Target-X. Target-X se usó como una proteína de fusión hlgFc. Las selecciones se realizaron en solución usando perlas magnéticas acopladas a Proteína G (Dynabeads Protein G, Life Technologies) que pueden capturar el complejo antígeno-fago mediante la etiqueta Fc humana del antígeno.
60

La biblioteca de polipéptidos se manejó de acuerdo con protocolos estándar publicados para selecciones de péptidos basadas en la presentación en fagos (Zwick, MB, Menéndez, A., Bonnycastle, LLC y Scott, JK (2001). En CF Barbas, DR Burton, JK Scott y GJ Silverman, (Eds.), Phage Display: A Laboratory Manual (páginas 18.1-18.44). Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) con pequeños ajustes en términos de rigurosidad de selección y adaptación al sistema del vector fagémido.
65

5 Las selecciones de prueba se realizaron en 3 rondas de enriquecimiento posteriores con monitorización de secuencias específicas mediante secuenciación convencional. En resumen, todos los paneos se completaron con diversas concentraciones de antígeno (100 nM para la ronda 1, 50 nM para la ronda 2 y 25 nM para la ronda 3) en condiciones de lavado estándar. La proteína objetivo se incubó con fagos preadsorbidos. El lavado de las Dynabeads magnéticas recubiertas se llevó a cabo con un separador de partículas magnéticas y las incubaciones se realizaron por rotación en la parte superior en tubos de baja unión. Posteriormente, los fagos unidos específicamente se eluyeron usando glicina/HCl.

10 Se añadió *E. coli* TG1F⁺ con una DO a 600nm de 0,6-0,8 a los eluidos de fago de cada selección y se incubó en una incubadora sin agitación. Después de la infección, las bacterias se sembraron de manera uniforme en dos placas de agar grandes LB/cloranfenicol/glucosa para cada selección y se incubaron durante la noche a 37 °C y se prepararon patrones de fago en glicerol.

15 Para las siguientes rondas de paneo, se recogieron suspensiones bacterianas de cada grupo y se usaron para propagar fagos para una ronda de paneo adicional como se describió anteriormente.

20 Después de cada ronda de paneo se determinó el título del fago. El intervalo esperado va de 1,0E+10 - 1,0E+12 fagos/ml para la entrada y 1,0E+07 - 1,0E+09 fagos/ml para la salida. La Tabla 3 muestra la salida después de cada ronda de paneo y todos los valores están en el intervalo esperado.

Tabla 3: Títulos de salida de fagos

Biblioteca	Estrategia de paneo	Objetivo	Primera ronda de salida de fagos	Segunda ronda de salida de fagos	Tercera ronda de salida de fagos
HTH- lib1	Solución	Target-X/hFc	1,11E+07	1,45E+07	4,06E+08

25 Después de la finalización de las rondas de paneo, los grupos de salida de fagos se subclonaron mediante PCR en un vector de expresión para facilitar la expresión citoplasmática de los polipéptidos en *E. coli*. La expresión de clones individuales dio como resultado la producción de polipéptidos que estaban unidos en el terminal N a la proteína de unión a maltosa (MBP) y que incluyen un sitio de escisión de proteasa.

30 Para comprobar la especificidad del objetivo, se llevó a cabo una detección por ELISA mediante la captura de la proteína Target-X humana y de cynomolgus etiquetada con Fc, así como una proteína etiquetada con Fc no relacionada en la superficie de una placa de microtitulación recubierta previamente con un anticuerpo específico anti-Fc humano (Jackson Immuno Research) y lisados de *E. coli* que contienen los polipéptidos obtenidos de las salidas de paneo. Los polipéptidos unidos se detectaron mediante la etiqueta FLAG codificada usando detección anti-FLAG (anti-FLAG-AP, Sigma Aldrich). Para analizar la expresión de fusión MBP-polipéptido, se aplicó la detección de captura anti-His (R&D Systems) y anti-MBP (Abcam).

35 En total, se identificaron 280 polipéptidos que reconocen la proteína de fusión Target-X/Fc de cynomolgus en ELISA. Además, casi todos los clones positivos de cynomolgus (98%) revelaron reactividad cruzada con la proteína Target-X humana, pero no se unieron a una proteína de fusión Fc irrelevante.

40 El análisis de secuencia y ELISA de salidas de paneo de rondas de paneo posteriores revelaron un enriquecimiento de aglutinantes específicos, es decir, aglutinantes que se unen a la proteína objetivo pero no a proteínas no relacionadas.

45 **Ejemplo 6: Resultados de secuenciación de polipéptidos específicos de Target-X**

50 La secuenciación de Sanger se realizó para analizar los aglutinantes que son específicos para la proteína de fusión Target-X/Fc humana y de cynomolgus (véase el Ejemplo 5). Los resultados de la secuenciación revelaron un número diverso de polipéptidos específicos del objetivo como se representa en la Figura 9. Esto demuestra que la biblioteca de la presente divulgación puede usarse para identificar una gran variedad de polipéptidos que son específicos para la proteína objetivo de interés.

55 Como una siguiente etapa, se produjeron polipéptidos seleccionados de la campaña de detección a mayor escala con el fin de caracterizarlos con más detalle para propiedades, tales como ELISA y unión celular, afinidad y actividad funcional en un ensayo *in vitro* relevante.

Ejemplo 7: Caracterización de polipéptidos específicos purificados de Target-X para unión por ELISA

60 La unión a Target-X humano y de cynomolgus se probó en un ELISA.

Procedimientos:

Se capturaron 1,5 µg/ml de cada proteína de fusión Fc a través de un anticuerpo específico de captura de anti-Fc humano (Jackson Immuno Research) en placas Maxisorp y se detectaron fusiones unidas de MBP-polipéptido usando un anticuerpo de detección anti-FLAG.

5

Resultados:

Todos los 18 polipéptidos mostraron una unión significativa y específica a ambas proteínas Target-X/Fc de cynomolgus y humanas recombinantes. Los valores de EC₅₀ varían desde el intervalo nanomolar de uno a tres dígitos.

10

Tabla 4: Unión de ELISA a diferentes especies de Target-X.

	ELISA/EC ₅₀ (nM)	
	cynomolgus	humana
HTH00024	12,6	478
HTH00025	633	459
HTH00029	96	98

(continuación)

	ELISA/EC ₅₀ (nM)	
	cynomolgus	humana
HTH00031	80	86
HTH00032	203	337
HTH00033	738	678
HTH00034	3,1	3,1
HTH00035	28	20
HTH00036	85	79
HTH00037	65	109
HTH00039	54	80
HTH00040	90	150
HTH00041	111	114
HTH00042	19.4	15,7
HTH00043	154	194
HTH00044	485	429
HTH00055	93	94
HTH00056	196	503

15 Estos resultados confirman la naturaleza altamente específica de los polipéptidos aislados de la biblioteca de la presente divulgación.

Ejemplo 8: Caracterización de polipéptidos específicos de Target-X para la unión celular (FACS)

20 La unión celular a Target-X de cynomolgus expresada en células CHO se analizó mediante FACS.

Procedimientos:

25 Las células CHO estables transfectadas con Target-X de cynomolgus se ajustaron a 2×10^6 células/ml en PBS/FCS al 3%/NaN₃ al 0,02% (tampón FACS). La tinción con FACS se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en V y se mezclaron 1×10^5 células por pocillo con polipéptidos purificados, se diluyeron en tampón FACS y se incubaron en hielo durante 1 h. Las células se lavaron luego 4 veces con 150 µl de tampón FACS/pocillo y se recogieron en 50 µl de anticuerpo anti-MBP de conejo (Abcam), diluidos 1: 10000 en tampón FACS. Después de 1 h de incubación sobre hielo, las células se lavaron 4 veces con tampón FACS y se recogieron en 50 µl de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con ficoeritrina (Jackson Immuno Research), diluido 1:100 en tampón FACS. Después de 30 minutos de incubación en hielo, las células se lavaron 4 veces con tampón FACS, se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS y se midió la unión a la superficie celular de anticuerpos específicos Target-X de Cynomolgus mediante la intensidad de fluorescencia FL2 de las células en FACSArray (Becton Dickinson).

30

35 Resultados:

19 polipéptidos purificados mostraron unión celular específica a Target-X de cynomolgus expresados en células CHO con valores de EC₅₀ que varían desde el intervalo nanomolar de un solo dígito hasta el de tres dígitos.

Tabla 5: Unión celular (FACS) a las células CHO-Target-X de cynomolgus.

	Unión de células/EC ₅₀ (nM)
HTH00024	17,5
HTH00025	253
HTH00027	235
HTH00029	333
HTH00031	146
HTH00032	26
HTH00033	412
HTH00034	4,9
HTH00035	688
HTH00036	144
HTH00037	247
HTH00039	93

(continuación)

	Unión de células/EC ₅₀ (nM)
HTH00040	14,6
HTH00041	32
HTH00042	82
HTH00043	159
HTH00044	140
HTH00055	580
HTH00056	53

5

Nuevamente, este resultado confirma la naturaleza altamente específica de los polipéptidos aislados de la biblioteca de la presente divulgación. Los polipéptidos también pueden unirse a la proteína objetivo en células enteras.

10 **Ejemplo 9: Determinación de afinidad de un polipéptido específico de Target-X usando resonancia de plasmón superficial**

La caracterización cinética de la interacción entre Target-X/Fc de cynomolgus y el polipéptido específico de Target-X se realizó en formato de captura de ligando, con el polipéptido aplicado como analito en solución.

15

Procedimientos:

Un chip sensor CM5 de Biacore (GE Healthcare) se modificó covalentemente para generar una superficie de captura de alta densidad específica para Fc humano. Todas las celdas de flujo fueron inmovilizadas con aproximadamente 3500 RU de ligando MabSelect SuRe^{MR} (GE Healthcare; 50 µg/ml en tampón de acetato 10 mM, pH 4,5) utilizando la química estándar de acoplamiento de amina EDC-NHS. Se usó HBS-EP+ 10 mM pH 7,4 (GE Healthcare) como tampón de prueba y diluyente de muestra. Durante la caracterización cinética, se capturó Target-X/Fc en una celda de flujo específica anti-Fc humana (20 nM; inyección de 75 s; nivel de captura aproximadamente 250 RU), seguido de inyección de analito (asociación) durante 180 s y disociación (tiempos variables; hasta 600 s; caudal 40 µl/min). Se analizó una serie de diluciones seriales de 2 veces de concentraciones de analito de 1,37 a 1.000 nM. Al final de cada ciclo, el ligando capturado y el analito unido se eliminaron con glicina/HCl 10 mM, pH 1,5 mediante 2 inyecciones de 30 s. Se incluyeron inyecciones de blanco (concentración de analito = 0 nM) y se restaron para referenciación doble. Los sensorgramas resultantes se evaluaron con el software de evaluación 3.0 Biacore T200 (GE Healthcare) utilizando modelos cinéticos y de estado estable 1: 1.

30

Resultados:

La afinidad del polipéptido específico de Target-X se midió en Target-X/Fc de cynomolgus capturado en un sistema Biacore. La afinidad del polipéptido fue de 36 nM en un modelo cinético y de 45 nM en un modelo de estado estacionario (Tabla 6).

35

Esto demuestra que los polipéptidos de la presente divulgación no son solo altamente específicos sino que también se unen con una alta afinidad a sus objetivos.

40 **Ejemplo 10: Ensayo de inhibición de unión de Target-X/receptor de cynomolgus (ELISA)**

Procedimientos:

Se recubrieron 10 µg/ml de la proteína receptora recombinante relacionada con Target-X sobre una placa MSD y se bloqueó con leche en polvo. Se mezclaron diferentes concentraciones de un polipéptido libre de MBP específico de Target-X con 0,5 µg/ml de Target-X/Fc de cynomolgus y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar la placa bloqueada con MSD, se aplicaron mezclas de polipéptido-Target-X/Fc a la placa y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se detectó Target-X unido al receptor usando un anticuerpo específico anti-Fc humano conjugado con ECL (1:2000, Jackson Immuno Research). La inhibición de la interacción específica receptor/objetivo por el polipéptido conduce a señales decrecientes para que Target-X/Fc se una a su receptor.

Resultados:

Se analizó un polipéptido libre de MBP específico de Target-X de cynomolgus purificado para determinar su actividad inhibitora potencial *in vitro* en la interacción receptor/Target-X de cynomolgus. El polipéptido mostró una inhibición significativa de la interacción receptor/Target-X de cynomolgus en un ELISA con un valor de IC₅₀ de 14,7 nM.

Tabla 6: Sumario de los resultados de la caracterización *in vitro*

	Péptido libre de MBP:
ELISA (EC50)	6,3 nM
FACS (EC50)	6,5 nM
SPR (Kd)	45 nM
Inhibición (IC50)	14,7 nM

Ejemplo 11: Análisis estructural del diseño hélice-giro-hélice de polipéptidos específicos de Target-X

El contenido de hélice α de un polipéptido específico de Target-X se analizó midiendo espectros de dicroísmo circular (CD) en tampón de fosfato 10 mM (pH 7,2) con una concentración de péptido de 0,1 mg/ml, usando un espectrofotómetro de CD Chirascan Plus (Applied Photophysics).

Como se muestra en la Figura 8, el polipéptido exhibió mínimos dobles a 208 y 222 nm, lo que indica que el polipéptido tiene un alto contenido de estructura de hélice α en solución acuosa.

Además, la estabilidad térmica se determinó incubando el polipéptido en solución acuosa a temperaturas crecientes que varían de 20 °C a 90 °C. El análisis de los espectros de CD reveló que el polipéptido no mostró casi ningún despliegue estructural incluso después del tratamiento a 90 °C (Figura 8).

Ejemplo 12: Estabilidad del diseño hélice-giro-hélice

La estabilidad frente a la desnaturalización química se determinó incubando un polipéptido que comprende la secuencia de referencia HTHdes2, en clorhidrato de guanidina 2 y 4 molar (GdmHCL) a 20 °C. Incluso el tratamiento con GdmHCL 4M no resultó en el despliegue completo del polipéptido. En otro experimento, el polipéptido se trató con GdmHCL 2M más temperaturas crecientes que varían de 22 °C a 90 °C. De nuevo, incluso después del tratamiento con GdmHCL 2M a 90 °C, no se pudo observar un despliegue completo del polipéptido.

Se examinó la estabilidad frente a la desnaturalización de pH bajo para una variante de secuencia del polipéptido de secuencia de referencia HTHdes2, en el que se intercambiaron 6 residuos de aminoácidos en la Hélice-2. El tratamiento del polipéptido en pH 2 durante 60 minutos con o sin neutralización posterior a un pH de 7,2 no alteró el contenido de hélice α del polipéptido.

Todos los estudios realizados demuestran claramente las propiedades superiores de estabilidad de los polipéptidos, que pueden aislarse de la biblioteca de la presente divulgación.

Listado de secuencias

<110> MORPHOSYS AG

<120> BIBLIOTECA DE POLIPÉPTIDOS

<130> MS243/PCT

<140> EP 16158782.9

<141> 2016-03-04

- <160> 67
- <170> PatentIn versión 3.5
- 5 <210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar = "T" o "N" o "S" o "P"
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2) .. (2)
<223> /reemplazar = "P" o "Q" o "W" o "D"
- 25 <220>
<221> MOD-RES
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "A" o "I" o "Q" o "R"
- 40 <220>
<221> MOD-RES
<222> (6) .. (6)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9) .. (9)
<223> /reemplazar = "L" o "R" o "M" o "K" o "E"
- 60 <220>
<221> MOD-RES
<222> (10)..(10)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 65 <220>
<221> VARIANTE

- <222> (11)..(11)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> /reemplazar = "L" o "A" o "W" o "F" o "K"
- 10 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(15)
 <223> / nota = "Los residuos de variantes suministrados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para posiciones variantes"
- 30 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Glu | Xaa | Ala | Met | Xaa | Ala | Ala | Ala | Xaa | Ala | Met | Xaa | Ala | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
- 35 <210> 2
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"
- 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "T" o "N" o "S" o "P"
- 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2) .. (2)
 <223> /reemplazar = "P" o "Q" o "W" o "D"
- 55 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 65 <220>
 <221> VARIANTE

- <222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "A" o "I" o "Q" o "R"
- 5 <220>
<221> MOD-RES
<222> (6) .. (6)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9) .. (9)
<223> /reemplazar = "L" o "R" o "M" o "K" o "E"
- 25 <220>
<221> MOD-RES
<222> (10)..(10)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar = "L" o "A" o "W" o "F" o "K"
- 40 <220>
<221> MOD-RES
<222> (13)..(13)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(14)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (15)..(15)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 55 <220>
<221> MOD-RES
<222> (16)..(45)
<223> Cualquier aminoácido o no presente
- 60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(45)
<223> / nota = "Esta región puede abarcar de 1 a 30 residuos de aminoácidos"
- 65 <220>
<221> VARIANTE

- <222> (46)..(46)
<223> /reemplazar = "T" o "N" o "S" o "P"
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (47)..(47)
<223> /reemplazar = "P" o "Q" o "W" o "D"
- 10 <220>
<221> MOD-RES
<222> (48)..(48)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (49) .. (49)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (50)..(50)
<223> /reemplazar = "A" o "I" o "Q" o "R"
- 25 <220>
- 30 <221> MOD-RES
<222> (51)..(51)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (52) .. (52)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (53)..(53)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (54)..(54)
<223> /reemplazar = "L" o "R" o "M" o "K" o "E"
- 50 <220>
<221> MOD-RES
<222> (55)..(55)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (56) .. (56)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (57)..(57)
<223> /reemplazar = "L" o "A" o "W" o "F" o "K"
- 65 <220>
<221> MOD-RES
<222> (58)..(58)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62

- <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 5 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 15 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 30 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (16)..(45)
 <223> Cualquier aminoácido o no presente
- 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (16)..(45)
 <223> / note = "Esta región puede abarcar de 1 a 30 residuos de aminoácidos"
- 40 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (48)..(48)
 <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49) .. (49)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 50 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (51)..(51)
 <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (52) .. (52)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (53)..(53)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 65 <220>
 <221> MOD-RES

- <222> (55)..(55)
 <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (56) .. (56)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 10 <220>
 <221> MOD-RES
 <222> (58)..(58)
 <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (59) .. (59)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (60)..(60)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(60)
 <223> /nota = "Residuos variantes suministrados en la secuencia no tienen preferencia con respecto con respecto a aquellos en las anotaciones para posiciones variantes"
- 30 <400> 3

Asp Glu Xaa Ala Gln Xaa Ala Ala Glu Xaa Ala Lys Xaa Ala Ala Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25 30

Xaa Asp Glu Xaa
 35 40 45

Ala Ala Xaa Ala Ala Lys Xaa Ala Met Xaa Ala Ala
 50 55 60

- 35 <210> 4
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
- 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "T" o "N" o "S" o "P"
- 50 <220>
 <221> VARIANTE

- <222> (2) .. (2)
<223> /reemplazar = "P" o "Q" o "W" o "D"
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar = "V" o "I"
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "A" o "I" o "Q" o "R"
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6) .. (6)
<223> /reemplazar = "V" o "I"
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9) .. (9)
<223> /reemplazar = "L" o "R" o "M" o "K" o "E"
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar = "V" o "I"
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar = "L" o "A" o "W" o "F" o "K"
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar = "V" o "I"
- 60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(14)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 65 <220>
<221> VARIANTE

<222> (15)..(15)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"

<220>
 5 <221> MOD-RES
 <222> (16)..(45)
 <223> Cualquier aminoácido o no presente

<220>
 10

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (16)..(45)
 <223> / note = "Esta región puede abarcar de 1 a 30 residuos de aminoácidos"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (46)..(46)
 <223> /reemplazar = "T" o "N" o "S" o "P"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (47)..(47)
 <223> /reemplazar = "P" o "Q" o "W" o "D"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (48)..(48)
 <223> /reemplazar = "V" o "I"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49)..(49)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (50)..(50)
 <223> /reemplazar = "A" o "I" o "Q" o "R"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (51)..(51)
 <223> /reemplazar = "V" o "I"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (52)..(52)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (53)..(53)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (54)..(54)
 <223> /reemplazar = "L" o "R" o "M" o "K" o "E"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (55)..(55)
 <223> /reemplazar = "V" o "I"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (56) .. (56)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (57)..(57)
 <223> /reemplazar = "L" o "A" o "W" o "F" o "K"
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (58)..(58)
 <223> /reemplazar = "V" o "I"
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (59) .. (59)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (60)..(60)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1) .. (60)
 <223> / nota = "Los residuos variantes suministrados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos
 30 en las anotaciones para posiciones variantes"
 <400> 4

 Asp Glu Leu Ala Met Leu Ala Ala Ala Leu Ala Met Leu Ala Ala Xaa
 1 5 10 15

 Xaa
 20 25 30

 Xaa Asp Glu Leu
 35 40 45

 Ala Met Leu Ala Ala Ala Leu Ala Met Leu Ala Ala
 50 55 60
 35
 <210> 5
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar = "T" o "N" o "S" o "P"
 50
 <220>
 <221> VARIANTE

- <222> (2) .. (2)
<223> /reemplazar = "P" o "Q" o "W" o "D"
- 5 <220>
<221> MOD-RES
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "A" o "I" o "Q" o "R"
- 20 <220>
<221> MOD-RES
<222> (6) .. (6)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar = "R" o "Q"
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9) .. (9)
<223> /reemplazar = "L" o "R" o "M" o "K" o "E"
- 40 <220>
<221> MOD-RES
<222> (10)..(10)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar = "L" o "A" o "W" o "F" o "K"
- 55 <220>
<221> MOD-RES
<222> (13)..(13)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(14)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 65 <220>
<221> VARIANTE

- <222> (15)..(15)
<223> /reemplazar = "Q" o "H"
- 5 <220>
<221> MOD-RES
<222> (16)..(45)
<223> Cualquier aminoácido o no presente
- 10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(45)
<223> / note = "Esta región puede abarcar de 1 a 30 residuos de aminoácidos"
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (46)..(46)
<223> /reemplazar = "T" o "N" o "S" o "P"
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (47)..(47)
<223> /reemplazar = "P" o "Q" o "W" o "D"
- 25 <220>
<221> MOD-RES
<222> (48)..(48)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (49) .. (49)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (50)..(50)
<223> /reemplazar = "A" o "I" o "Q" o "R"
- 40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (51)..(51)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (52) .. (52)
<223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (53)..(53)
<223> /reemplazar = "R" o "Q"
- 55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (54)..(54)
<223> /reemplazar = "L" o "R" o "M" o "K" o "E"
- 60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (55)..(55)
<223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62
- 65 <220>
<221> VARIANTE

- <222> (56) .. (56)
- <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"

- <220>
- 5 <221> VARIANTE
- <222> (57)..(57)
- <223> /reemplazar = "L" o "A" o "W" o "F" o "K"

- <220>
- 10 <221> MOD_RES
- <222> (58)..(58)
- <223> Cualquier residuo de aminoácido que tenga una cadena lateral que exhiba una hidrofobicidad mayor que 0,62

- <220>
- 15 <221> VARIANTE
- <222> (59) .. (59)
- <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"

- <220>
- 20 <221> VARIANTE
- <222> (60) .. (60)
- <223> /reemplazar = "Q" o "H"

- <220>
- 25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (1) .. (60)
- <223> / nota = "Los residuos variantes suministrados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para posiciones variantes"

- <400> 5

```

Asp Glu Xaa Ala Met Xaa Ala Glu Ala Xaa Ala Met Xaa Ala Arg Xaa
1           5           10           15

Xaa Xaa
          20           25           30

Xaa Asp Glu Xaa
          35           40           45

Ala Met Xaa Ala Glu Ala Xaa Ala Met Xaa Ala Arg
          50           55           60
    
```

- 35 <210> 6
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 40 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

- <400> 6
- 45

- Gln Gly Val Asp Ser
- 1 5

- <210> 7
- 50 <211> 35
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24) .. (24)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (27) .. (27)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (28) .. (28)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(31)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (34)..(34)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 60

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)..(35)
 <223> /reemplazar = "D" o "E" o "F" o "H" o "I" o "K" o "L" o "M" o "N" o "Q" o "R" o "S" o "T" o "V" o "W" o "Y"
 65

ES 2 804 907 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (1)..(35)

5 <223> / nota = "Los residuos variantes suministrados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para posiciones variantes"

<400> 7

Asp Glu Leu Ala Gln Leu Ala Ala Glu Leu Ala Lys Leu Ala Ala Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ala Ala Leu Ala Ala Lys Leu Ala Met
20 25 30

Leu Ala Ala
35

10

<210> 8

<211> 35

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

20

<400> 8

Asp Glu Leu Ala Gln Leu Glu Arg Glu Leu Met Lys Leu Lys Ala Gln
1 5 10 15

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

Leu Ala Arg
35

25

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

35

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "R" o "N" o "D" o "E" o "Q" o "H" o "I" o "L" o "K" o "M" o "F" o "S" o "T" o "W" o "Y" o "V"

40

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "R" o "N" o "D" o "E" o "Q" o "H" o "I" o "L" o "K" o "M" o "F" o "S" o "T" o "W" o "Y" o "V"

45

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "Q" o "E"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 5 <223> /reemplazar = "R" o "N" o "D" o "E" o "Q" o "H" o "I" o "L" o "K" o "M" o "F" o "S" o "T" o "W" o "Y" o "V"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 10 <223> /reemplazar = "R" o "N" o "D" o "E" o "Q" o "H" o "I" o "L" o "K" o "M" o "F" o "S" o "T" o "W" o "Y" o "V"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 15 <223> /reemplazar = "Q" o "H"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24) .. (24)
 20 <223> /reemplazar = "R" o "N" o "D" o "E" o "Q" o "H" o "I" o "L" o "K" o "M" o "F" o "S" o "T" o "W" o "Y" o "V"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (27) .. (27)
 25 <223> /reemplazar = "R" o "N" o "D" o "E" o "Q" o "H" o "I" o "L" o "K" o "M" o "F" o "S" o "T" o "W" o "Y" o "V"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (28) .. (28)
 30 <223> /reemplazar = "Q" o "E"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(31)
 35 <223> /reemplazar = "R" o "N" o "D" o "E" o "Q" o "H" o "I" o "L" o "K" o "M" o "F" o "S" o "T" o "W" o "Y" o "V"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (34)..(34)
 40 <223> /reemplazar = "R" o "N" o "D" o "E" o "Q" o "H" o "I" o "L" o "K" o "M" o "F" o "S" o "T" o "W" o "Y" o "V"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)..(35)
 45 <223> /reemplazar = "Q" o "H"

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(35)
 50 <223> / nota = "Los residuos variantes suministrados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para posiciones variantes"

<400> 9

55

	Asp	Glu	Leu	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Arg	Gln
	1				5					10					15	
	Gly	Val	Asp	Ser	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Lys	Leu	Ala	Met
			20						25					30		
	Leu	Ala	Arg													
			35													

<210> 10
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 10

 Asp Glu Leu Ala Gln Leu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Leu Glu Arg Gln
 1 5 10 15

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

 Leu Trp Gln
 35
 15 <210> 11
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 11
 25
 Asp Glu Leu Ala Gln Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Leu His Gln Gln
 1 5 10 15

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

 Leu Gln Arg
 35
 30 <210> 12
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 40 <400> 12

ES 2 804 907 T3

Asp Glu Leu Asp Gln Leu Phe Glu Glu Leu Arg Lys Leu Asn Arg Gln
 1 5 10 15

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

Leu Leu Gln
 35

5 <210> 13
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 13

15 Asp Glu Leu Asp Gln Leu His Glu Glu Leu Asp Lys Leu Phe Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ser Ala Leu Ser Glu Lys Leu Lys Met
 20 25 30

Leu Ser Gln
 35

20 <210> 14
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 14

Asp Glu Leu Glu Gln Leu Ala Arg Glu Leu Ala Lys Leu Tyr Arg Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Glu Ala Leu Trp Glu Lys Leu Gln Met
 20 25 30

Leu Arg Gln
 35

35 <210> 15
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

ES 2 804 907 T3

<400> 15

Asp Glu Leu Glu Gln Leu Asp Gln Glu Leu His Lys Leu Tyr Gln Gln
1 5 10 15

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

Leu Ile Arg
35

5

<210> 16

<211> 35

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

15

<400> 16

Asp Glu Leu Phe Gln Leu Ala Glu Glu Leu Lys Lys Leu Asp His Gln
1 5 10 15

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

Leu Phe His
35

20

<210> 17

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

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

30

<400> 17

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

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Asp Ala Leu His Glu Lys Leu Glu Met
20 25 30

Leu Asn Gln
35

35

<210> 18

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 804 907 T3

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

5 <400> 18

Asp Glu Leu His Gln Leu Glu Glu Glu Leu Glu Lys Leu Ser Gln Gln
 1 5 10 15

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

Leu Met Arg
 35

<210> 19
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 19

20

Asp Glu Leu His Gln Leu His Glu Glu Leu Ile Lys Leu Ile His Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Asn Ala Leu Trp Arg Lys Leu Glu Met
 20 25 30

Leu His His
 35

25 <210> 20
 <211> 35
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

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

35 <400> 20

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

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ala Ala Leu Met Glu Lys Leu Lys Met
 20 25 30

Leu Arg Gln
 35

40 <210> 21
 <211> 35

ES 2 804 907 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 21

10 Asp Glu Leu Ile Gln Leu Phe Gln Glu Leu Phe Lys Leu Ser His Gln
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Thr Ala Leu Lys Arg Lys Leu Phe Met
 20 25 30
 Leu Lys His
 35

15 <210> 22
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 22

25 Asp Glu Leu Lys Gln Leu Asn Glu Glu Leu Glu Lys Leu Val Gln Gln
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Gln Ala Leu Asp Arg Lys Leu Ala Met
 20 25 30
 Leu Asn Gln
 35

30 <210> 23
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 23

ES 2 804 907 T3

Asp Glu Leu Lys Gln Leu Tyr Gln Glu Leu Val Lys Leu His His Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ala Ala Leu Trp Arg Lys Leu Asn Met
 20 25 30

Leu Tyr Arg
 35

5 <210> 24
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 24

15 Asp Glu Leu Leu Gln Leu Asp Glu Glu Leu Ser Lys Leu Met Arg Gln
 1 5 10 15

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

Leu Glu His
 35

20 <210> 25
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 25

Asp Glu Leu Leu Gln Leu Ile Glu Glu Leu Thr Lys Leu Arg His Gln
 1 5 10 15

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

Leu Thr Gln
 35

35 <210> 26
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

ES 2 804 907 T3

<400> 26

Asp Glu Leu Met Gln Leu Asp Glu Glu Leu Lys Lys Leu Thr His Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Leu Ala Leu His Glu Lys Leu Ser Met
20 25 30

Leu Tyr His
35

5

<210> 27

<211> 35

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

15

<400> 27

Asp Glu Leu Met Gln Leu His Gln Glu Leu Lys Lys Leu Gln His Gln
1 5 10 15

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

Leu Trp Arg
35

20

<210> 28

<211> 35

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

30

<400> 28

Asp Glu Leu Asn Gln Leu Ala Glu Glu Leu Lys Lys Leu Thr Gln Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Met Ala Leu Gln Glu Lys Leu Asn Met
20 25 30

Leu Phe Gln
35

35

<210> 29

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 804 907 T3

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

5 <400> 29

Asp Glu Leu Gln Gln Leu Lys Gln Glu Leu Arg Lys Leu Lys Gln Gln
 1 5 10 15

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

Leu Thr Arg
 35

10 <210> 30
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

20 <400> 30

Asp Glu Leu Gln Gln Leu Leu Glu Glu Leu Asp Lys Leu Met Gln Gln
 1 5 10 15

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

25 Leu Trp Gln
 35

30 <210> 31
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 31

Asp Glu Leu Arg Gln Leu Ala Glu Glu Leu Val Lys Leu Glu Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Gln Ala Leu Arg Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

40 Leu Thr Gln
 35

ES 2 804 907 T3

Asp Glu Leu Ser Gln Leu Glu Glu Glu Leu Phe Lys Leu His Arg Gln
1 5 10 15

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

Leu Val His
35

5 <210> 35
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 35

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

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

Leu Thr Gln
35

20 <210> 36
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 36

Asp Glu Leu Thr Gln Leu Lys Glu Glu Leu Lys Lys Leu Leu His Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Trp Ala Leu Leu Glu Lys Leu Arg Met
20 25 30

Leu Met Gln
35

35 <210> 37
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

ES 2 804 907 T3

<400> 37

Asp Glu Leu Val Gln Leu Asn Glu Glu Leu Lys Lys Leu Phe His Gln
1 5 10 15

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

Leu Arg Gln
35

5

<210> 38

<211> 35

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

15

<400> 38

Asp Glu Leu Trp Gln Leu Ala Glu Glu Leu Arg Lys Leu Met Arg Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Met Ala Leu Trp Gln Lys Leu Val Met
20 25 30

Leu Met Gln
35

20

<210> 39

<211> 35

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

30

<400> 39

Asp Glu Leu Trp Gln Leu His Glu Glu Leu Asp Lys Leu Lys Arg Gln
1 5 10 15

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

Leu Met His
35

35

<210> 40

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 804 907 T3

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

5 <400> 40

Asp Glu Leu Tyr Gln Leu Glu Gln Glu Leu Asn Lys Leu Phe His Gln
 1 5 10 15

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

Leu Asp His
 35

10 <210> 41
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

20 <400> 41

Asp Glu Leu Tyr Gln Leu Phe Gln Glu Leu Leu Lys Leu Leu His Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Asn Ala Leu Glu Gln Lys Leu Trp Met
 20 25 30

Leu Val Arg
 35

25 <210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Etiqueta sintética 6xHis"

35 <400> 42

His His His His His His
 1 5

40 <210> 43
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

ES 2 804 907 T3

<400> 43

Asp Glu Leu Met Gln Leu Met Glu Glu Leu Val Lys Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Trp Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
20 25 30

Leu Ser His
35

5

<210> 44

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

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

15

<400> 44

Asp Glu Leu Ser Gln Leu Met Glu Glu Leu Glu Lys Leu Asn Arg Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Trp Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
20 25 30

20

Leu Thr His
35

25

<210> 45

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

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

<400> 45

35

Asp Glu Leu Ser Gln Leu Met Gln Glu Leu Thr Lys Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Tyr Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
20 25 30

Leu Thr His
35

40

<210> 46

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 804 907 T3

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

5
 <400> 46

Asp Glu Leu His Gln Leu Ala Glu Glu Leu Trp Lys Leu Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Glu Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

Leu Thr His
 35

10
 <210> 47
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

20
 <400> 47

Asp Glu Leu Ala Gln Leu Ala Glu Glu Leu Arg Lys Leu Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Trp Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

Leu Ser His
 35

25
 <210> 48
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35
 <400> 48

Asp Glu Leu Phe Gln Leu Ala Glu Glu Leu Lys Lys Leu Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ala Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

Leu Thr His
 35

40

ES 2 804 907 T3

<210> 49
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 49

 Asp Glu Leu Leu Gln Leu Ala Glu Glu Leu Asp Lys Leu Asn Arg Gln
 1 5 10 15

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

 Leu Thr His
 35
 15 <210> 50
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 50
 25
 Asp Glu Leu Thr Gln Leu Ala Glu Glu Leu Val Lys Leu Asn Gln Gln
 1 5 10 15

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

 Leu Thr His
 35
 30 <210> 51
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 51

ES 2 804 907 T3

Asp Glu Leu Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Leu Glu Lys Leu Asn Arg Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ala Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
20 25 30

Leu Thr His
35

5 <210> 52
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 52

Asp Glu Leu Asp Gln Leu Ile Glu Glu Leu Thr Lys Leu Asn Arg Gln
1 5 10 15

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

Leu Ser His
35

15 <210> 53
<211> 35
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

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

<400> 53

Asp Glu Leu Leu Gln Leu Ser Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Asn Arg Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Trp Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
20 25 30

Leu Ser His
35

30 <210> 54
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

ES 2 804 907 T3

<400> 54

Asp Glu Leu Asn Gln Leu Met Glu Glu Leu Val Lys Leu Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Trp Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

Leu Ser His
 35

5

<210> 55
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

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

15

<400> 55

Asp Glu Leu Arg Gln Leu Met Glu Glu Leu Lys Lys Leu Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Gln Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

20

Leu Thr His
 35

25

<210> 56
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

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

<400> 56

35

Asp Glu Leu Ala Gln Leu Ala Glu Glu Leu Arg Lys Leu Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Tyr Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

Leu Ser His
 35

40

<210> 57
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 804 907 T3

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

5 <400> 57

```

Asp Glu Leu Ala Gln Leu Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Glu Gln Gln
1          5          10          15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Asp Ala Leu His Gln Lys Leu Ile Met
          20          25          30

Leu Tyr Arg
          35
  
```

10 <210> 58
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

20 <400> 58

```

Asp Glu Leu Asp Gln Leu Glu Glu Glu Leu Trp Lys Leu Asn Gln Gln
1          5          10          15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Glu Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
          20          25          30

Leu Thr His
          35
  
```

25 <210> 59
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 59

```

Asp Glu Leu Leu Gln Leu Ser Glu Glu Leu Tyr Lys Leu Asn Arg Gln
1          5          10          15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Tyr Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
          20          25          30

Leu Thr His
          35
  
```

35 <210> 60
 <211> 35

ES 2 804 907 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 60

10 Asp Glu Leu Met Gln Leu Phe Glu Glu Leu Thr Lys Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Tyr Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
20 25 30

Leu Thr His
35

<210> 61
<211> 35
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 61

Asp Glu Leu Met Gln Leu Met Glu Glu Leu Val Lys Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

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

Leu Thr His
35

25 <210> 62
<211> 35
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 62

Asp Glu Leu Gln Gln Leu Lys Glu Glu Leu Thr Lys Leu Asn Gln Gln
1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Tyr Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
20 25 30

Leu Tyr His
35

ES 2 804 907 T3

<210> 63
 <211> 35
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10
 <400> 63

 Asp Glu Leu Ser Gln Leu Met Glu Glu Leu Glu Lys Leu Asn Arg Gln
 1 5 10 15

 Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ala Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

 Leu Thr His
 35
 15
 <210> 64
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 25 <400> 64

 Asp Glu Leu Ser Gln Leu Met Glu Glu Leu Glu Lys Leu Asn Arg Gln
 1 5 10 15

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

 Leu Ser His
 35
 30 <210> 65
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 40 <400> 65

ES 2 804 907 T3

Asp Glu Leu Thr Gln Leu Ala Glu Glu Leu Lys Lys Leu Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ala Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

Leu Ser His
 35

5 <210> 66
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 66

15 Asp Glu Leu Val Gln Leu Arg Gln Glu Leu Ala Lys Leu Ile His Gln
 1 5 10 15

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

Leu Glu Gln
 35

20 <210> 67
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 67

30 Asp Glu Leu Tyr Gln Leu Ile Glu Glu Leu Glu Lys Leu Asn Arg Gln
 1 5 10 15

Gly Val Asp Ser Asp Glu Leu Ala Ala Leu His Gln Lys Leu Leu Met
 20 25 30

Leu Ser His
 35

REIVINDICACIONES

1. Una biblioteca de polipéptidos, en la que cada miembro de la biblioteca comprende una estructura de armazón de hélice-giro-hélice de la fórmula Hélice-1 - Li - Hélice-2, en la que
- 5 Hélice-1 y Hélice-2 comprenden un primer y segundo péptido de hélice α , en la que cada uno de dichos péptidos de hélice α comprende la secuencia de aminoácidos
- 10 X1 - X2 - Hy - Var1 - X3 - Hy - Var1 - Var2 - X4 - Hy - Var1 - X5 - Hy - Var1 - Var3 (SEQ ID NO: 1),
en la que
- 15 X1 es D, T, N, S o P,
X2 es E, P, Q, W o D,
X3 es M, A, I, Q o R,
20 X4 es A, L, R, M, K o E,
X5 es M, L, A, W, F o K,
Hy es cualquier residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobicidad mayor que 0,62, y
- 25 Var1, Var2 y Var3 son mezclas de los aminoácidos naturales, excluyendo G, P y C,
Li es un enlazador, y
- 30 dicho primer y dicho segundo péptido de hélice α forman una estructura de hélice superenrollada antiparalela.
2. Una biblioteca de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el enlazador Li comprende de 1 a 30 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 2).
- 35 3. Una biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores (SEQ ID NO: 3), en la que
- 40 X1 es D,
X2 es E,
X3 es Q en la Hélice-1 y A en la Hélice-2,
X4 es E en la Hélice-1 y K en la Hélice-2, y
- 45 X5 es K en la Hélice-1 y M en la Hélice-2.
4. Una biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que Hy es L, V o I (SEQ ID NO: 4).
- 50 5. Una biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores (SEQ ID NO: 5), en la que
- 55 Var2 es una mezcla de R, Q y E, y
Var3 es una mezcla de R, Q y H.
6. Una biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los polipéptidos de dicha biblioteca se presenta en bacteriófagos.
7. Una biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha biblioteca comprende al menos 1×10^6 miembros de polipéptidos.
8. La biblioteca de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que cada miembro de dicha biblioteca está unido a al menos una fracción adicional.
- 65 9. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha fracción adicional es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, una toxina, una citocina, una enzima informadora, una fracción capaz de unirse a un ion

metálico, una etiqueta adecuada para detección y/o purificación, un dominio de homo o hetero asociación, una fracción que aumenta la solubilidad de una proteína, o una fracción que comprende un sitio de escisión enzimática.

5 10. Una colección de moléculas de ácido nucleico que codifican los miembros de la biblioteca de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

11. Un vector que comprende la colección de moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 10.

10 12. Una célula huésped recombinante que comprende la colección de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10 o el vector de acuerdo con la reivindicación 11.

13. Un procedimiento para aislar un polipéptido específico para un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

15 a. poner en contacto la biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 con un antígeno;

b. remover aquellos miembros de la biblioteca que no se unen al antígeno; y

20 c. recuperar aquellos miembros de la biblioteca que se unieron al antígeno.

14. Una estructura de armazón de hélice-giro-hélice de la fórmula Hélice-1 - Li - Hélice-2 unida a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en la que Hélice-1 y Hélice-2 comprenden un primer y un segundo péptido de hélice α que forman una estructura de hélice superenrollada antiparalela, en la que cada uno de dichos péptidos de hélice α comprende la secuencia de aminoácidos

25 X1 - X2 - Hy - Var1 - X3 - Hy - Var1 - Var2 - X4 - Hy - Var1 - X5 - Hy - Var1 - Var3 (SEQ ID NO: 1),

en la que

30 X1 es D, T, N, S o P,

X2 es E, P, Q, W o D,

35 X3 es M, A, I, Q o R,

X4 es A, L, R, M, K o E,

X5 es M, L, A, W, F o K,

40 Hy es cualquier residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral que exhibe una hidrofobicidad mayor que 0,62, y

Var1, Var2 y Var3 son mezclas de los aminoácidos naturales, excluyendo G, P y C, y

45 Li es un enlazador.

Figura 4 A

Biblioteca HTH-ilib1	Hélice-1										Hélice-2													
	4	7	8	11	14	15	24	27	28	31	34	35	4	7	8	11	14	15	24	27	28	31	34	35
Posición	Var 1	Var 1	Var 2	Var 1	Var 1	Var 3	Var 1	Var 1	Var 2	Var 1	Var 3	Var 1	Var 1	Var 1	Var 2	Var 1	Var 1	Var 2	Var 1	Var 1	Var 2	Var 1	Var 1	Var 3
Diseño de Biblioteca	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	EQR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	HQR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	EQR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	HQR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	EQR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	EQR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	EQR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	HQR
A	10	11		4	3		14	8		14		8			5				5			5		
C																								
D	17	7		16	12		10	9		10		9			9				9			9		
E	13	9	98	9	9		10	8	64	10		8			11				11			11		
F	4	8		7	19		8	6		8		6			7				7			7		
G																								
H	11	11		10	8	74	2	11		2		11			17				17			14		59
I	14	13		8	7		11	21		11		21			10				10			7		
K	8	10		17	10		13	7		13		7			9				9			7		
L	4	13		10	14		11	9		11		9			5				5			7		
M	24	15		4	10		20	15		20		15			13				13			14		
N	6	8		9	7		10	7		10		7			9				9			9		
P																								
Q	5	10	53	12	13	45	6	9		6		9			8		49		8			11		61
R	9	6	24	21	7	56	18	7	62	18		7			18				18			13		55
S	7	10		8	9		12	12		12		12			19				19			6		
T	17	11		16	10		9	12		9		12			11				11			15		
V	7	12		6	6		7	5		7		5			9				9			9		
W	12	14		8	13		7	15		7		15			9				9			17		
Y	7	7		10	17		7	14		7		14			6				6			16		
*																								
-																								
Elimin.					1																			
Inserc.																								
suma	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175

Figura 4B

Biblioteca HTH-1b1	Hélice-1						Hélice-2					
	4	7	8	11	14	15	24	27	28	31	34	35
Posición	Var 1	Var 1	Var 2	Var 1	Var 1	Var 3	Var 1	Var 1	Var 2	Var 1	Var 1	Var 3
Diseño de Biblioteca	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	EQR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	HOR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	EOR	ADEFHIK LMNQRS TVWY	ADEFHIK LMNQRS TVWY	HOR
A	6%	6%	6%	2%	2%	8%	6%	5%	6%	3%	3%	6%
C				6%	6%							
D	10%	4%		3%	7%		5%	5%		5%	5%	6%
E	7%	5%	56%	5%	5%		6%	5%	37%	6%	3%	6%
F	2%	5%	33%	4%	11%		5%	3%	33%	4%	6%	6%
G				6%	6%		6%	6%		6%	6%	6%
H	6%	6%		6%	5%	42%	1%	5%		10%	8%	34%
I	8%	7%		5%	4%	33%	5%	12%		6%	4%	33%
K	5%	6%		10%	6%		7%	4%		5%	4%	6%
L	2%	7%		6%	8%		6%	5%		3%	4%	6%
M	14%	6%		2%	6%		11%	9%		7%	8%	6%
N	3%	5%		5%	4%		6%	4%		5%	5%	6%
P				6%	6%		6%	6%		6%	6%	6%
Q	3%	6%	30%	7%	7%	26%	3%	5%	28%	5%	6%	35%
R	5%	3%	14%	12%	4%	32%	6%	4%	35%	10%	7%	31%
S	4%	6%	33%	5%	6%	33%	6%	6%	33%	6%	6%	33%
T	10%	6%		6%	6%		7%	7%		6%	6%	6%
V	4%	7%		3%	3%		4%	3%		5%	5%	6%
W	7%	8%		5%	7%		4%	9%		5%	10%	6%
Y	4%	4%		6%	10%		4%	8%		3%	9%	6%
*	6%	6%		6%	6%		6%	6%		6%	6%	6%
Inserc.												
Elimin.					1%							

Distribución:
Diseno:

Figura 5

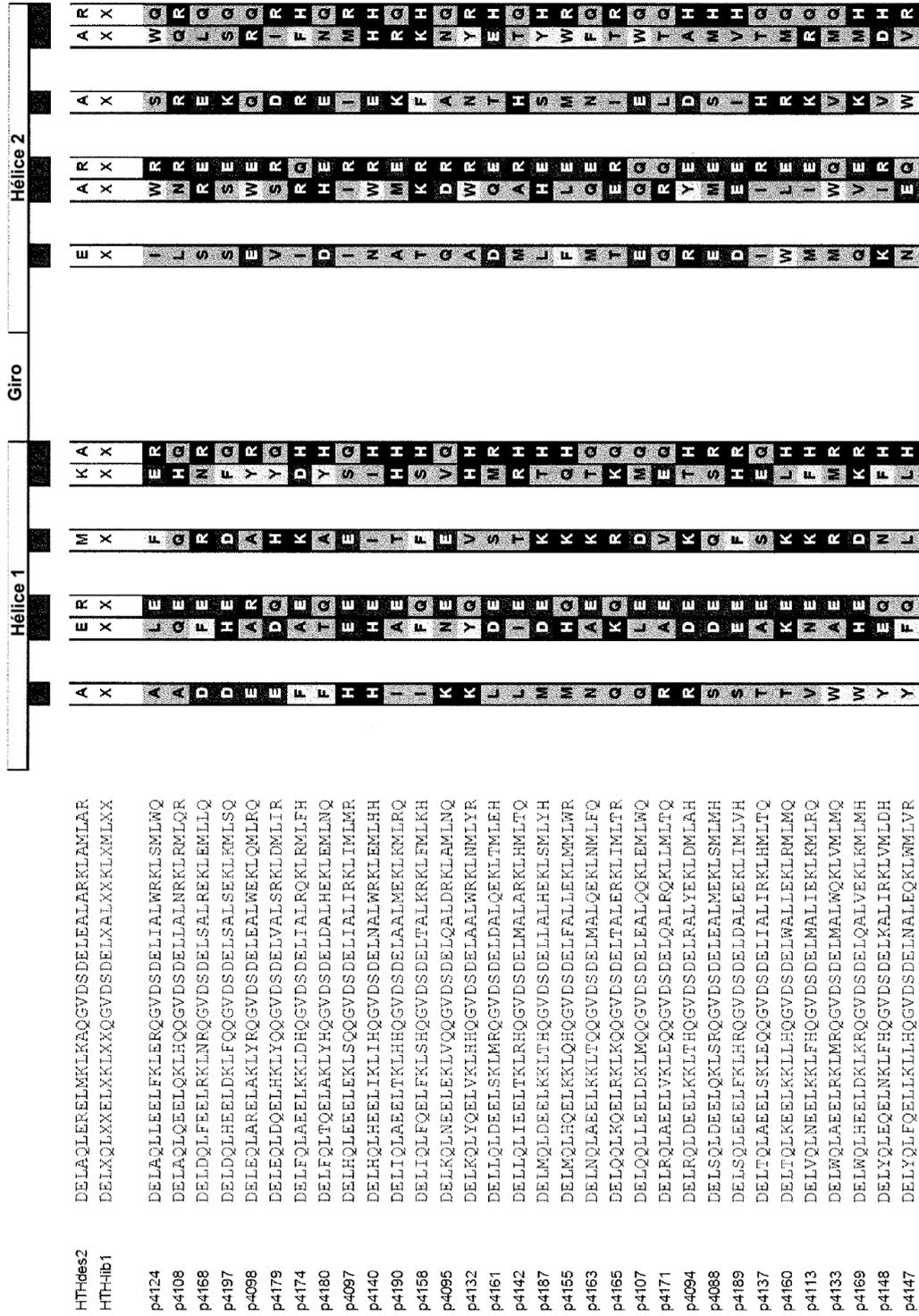
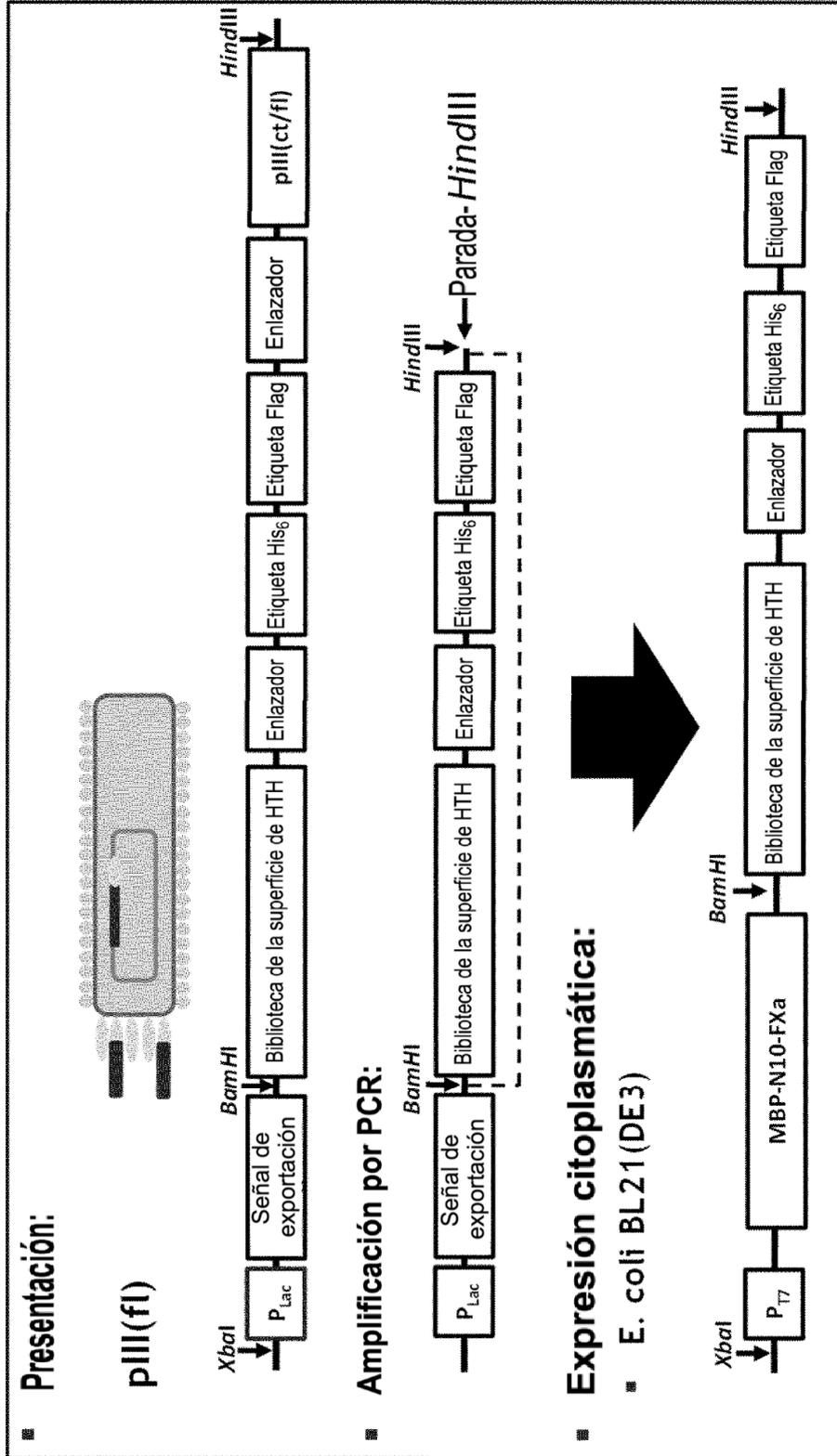


Figura 6



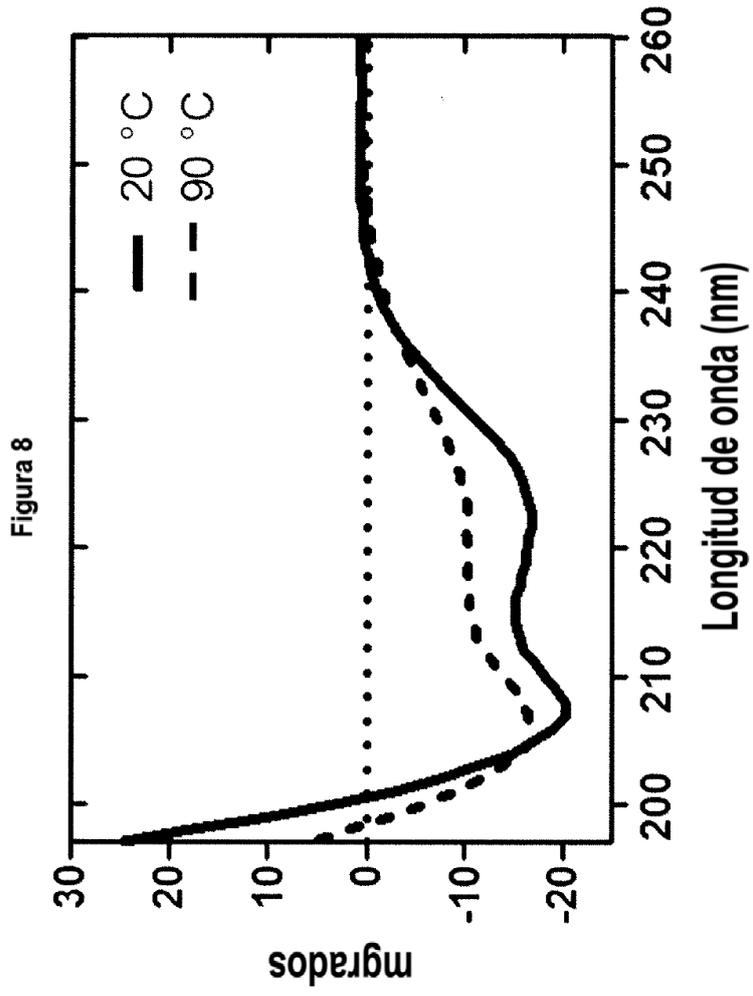


Figura 9

