

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 526**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2013 E 15172149 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 2949667**

54 Título: **Proteínas de captura de la superficie celular recombinantes**

30 Prioridad:

14.11.2012 US 201261726040 P

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

12.02.2021

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591 , US**

72 Inventor/es:

**DESHPANDE, DIPALI;
CHEN, GANG;
BURAKOV, DARYA;
FANDL, JAMES;
ALDRICH, THOMAS y
KAMAT, VISHAL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 805 526 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de captura de la superficie celular recombinantes

5 Antecedentes

Campo de la invención

10 El campo de la presente invención se refiere a proteínas de captura de la superficie celular recombinantes y a métodos para identificar, aislar y enriquecer células que producen proteínas secretadas que son heterodímeros, por ejemplo, proteínas biespecíficas. Más específicamente, las proteínas de captura de la superficie celular y los métodos permiten un aislamiento rápido y eficiente de líneas celulares productoras de anticuerpos recombinantes con alta expresión, incluyendo el aislamiento rápido y eficiente de hibridomas y células específicas que secretan proteínas heterodiméricas, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, enriqueciendo de este modo las especies heterodiméricas (molécula biespecífica) y aislando preferencialmente las especies heterodiméricas de las homodiméricas.

20 Se conocen métodos de la técnica anterior para expresar un gen de interés (GOI) en una célula hospedadora. Brevemente, se introduce un vector de expresión que porta el GOI en la célula. Después de la integración estable, los métodos convencionales para aislar células con alta expresión implican la recogida de grupos de células, la recogida manual de colonias de las placas, el aislamiento de células individuales mediante dilución limitada u otros métodos conocidos en la técnica. Después, se expanden grupos o clones individuales y se analiza sistemáticamente la producción de la proteína de interés (POI) midiendo directamente la actividad de la POI, mediante detección inmunológica de la POI o mediante otras técnicas adecuadas. Estos procedimientos son laboriosos, ineficientes, costosos y el número de clones que pueden analizarse está normalmente limitado a unos pocos cientos.

25 El alto grado de heterogeneidad en la expresión de proteínas por las células después de la integración estable requiere que se analicen sistemáticamente clones individuales con el objetivo de identificar el raro evento de integración que da como resultado una línea celular estable de producción con alta expresión. Esta necesidad reclama métodos que posibiliten una rápida identificación y aislamiento de células que expresan el mayor nivel de producción de proteína. Además, la recogida de grupos de clones o de colonias recogidas a mano tiene el riesgo de perder las células con alta expresión, que normalmente crecen más lentamente, en favor de células con crecimiento más rápido y baja expresión. Por lo tanto, existe la necesidad de métodos que permitan la rápida exploración y aislamiento de células individuales capaces de expresar a alto nivel una POI secretada. Cuando la POI contiene más de una subunidad, es necesario seleccionar preferencialmente una especie heterodimérica frente a una especie homodimérica.

30 La incorporación de la citometría de flujo en los métodos usados para el aislamiento de líneas celulares con expresión estable ha mejorado la capacidad de analizar sistemáticamente grandes números de clones individuales, aunque los métodos disponibles en la actualidad siguen siendo inadecuados por diversos motivos. La difusión de la POI entre células con características diferentes también era un problema.

40 Se reconocen también los siguientes documentos:

- WO 02/057423 que se refiere al aislamiento de células que expresan proteínas secretadas; y
- U 2020/0331527 que se refiere a anticuerpos biespecíficos fácilmente aislados con un formato de inmunoglobulina nativo.

45 Breve resumen

50 La presente invención describe un método de detección sistemática de alto rendimiento para el rápido aislamiento de aquellas células que secretan una proteína heterodimérica detectando sistemáticamente de manera directa la proteína de interés (POI). La presente invención también permite monitorizar convenientemente la expresión de la POI en células individuales durante el proceso de producción. Además, esta tecnología puede aplicarse directamente a la detección sistemática de células productoras de anticuerpos biespecíficos o cualquier célula que produzca una proteína heterodimérica. La tecnología también puede aplicarse directamente a la detección sistemática de células que producen receptores de linfocitos T modificados, tales como, por ejemplo, células que producen formas solubles de receptores de linfocitos T.

60 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para detectar y aislar células que producen altos niveles de una proteína heterodimérica que tiene una primera subunidad y una segunda subunidad, comprendiendo el método:

(a) transfectar células con un ácido nucleico que codifica una proteína de captura de la superficie celular (CSCP), que es una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a antígeno y un dominio de anclaje a la membrana, en donde la célula expresa la proteína heterodimérica, en donde la proteína heterodimérica comprende múltiples subunidades y un primer sitio en la proteína heterodimérica reside en una primera subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre que tiene un resto de histidina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición

96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un segundo sitio en la proteína heterodimérica se encuentra en una segunda subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT, en donde la CSCP comprende un scFv capaz de unirse a la primera subunidad pero no a la segunda subunidad de la proteína heterodimérica y en donde (i) la CSCP se une al primer sitio en la proteína heterodimérica para formar un complejo de CSCP-proteína heterodimérica dentro de la célula hospedadora, (ii) el complejo de CSCP-proteína heterodimérica se transporta a través de la célula hospedadora y (iii) después se presenta sobre la superficie de la célula hospedadora;

(b) detectar una célula de (a) que expresa la CSCP con alto rendimiento;

(c) aislar y cultivar la célula que expresa la CSCP con alto rendimiento;

(d) detectar la proteína heterodimérica en la superficie de la célula aislada y cultivada de la etapa (c) con una molécula de detección que se une al segundo sitio en la proteína heterodimérica, en donde la molécula de detección comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT; y

(e) aislar la célula detectada en la etapa (d) que porta la proteína heterodimérica detectada en su superficie.

La presente invención proporciona además un método para detectar o aislar una célula que expresa de manera estable una proteína heterodimérica que tiene una primera subunidad y una segunda subunidad, comprendiendo el método las etapas de:

(a) expresar en una célula hospedadora:

(i) una proteína de captura de la superficie celular (CSCP) que comprende una proteína de unión a antígeno y un dominio de anclaje a la membrana y

(ii) una proteína heterodimérica, en donde la proteína heterodimérica comprende múltiples subunidades y un primer sitio en la proteína heterodimérica reside en una primera subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre que tiene un resto de histidina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un segundo sitio en la proteína heterodimérica se encuentra en una segunda subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT, en donde la CSCP comprende un scFv capaz de unirse a la primera subunidad pero no a la segunda subunidad de la proteína heterodimérica; y,

en donde (i) la CSCP se une al primer sitio en la proteína heterodimérica para formar un complejo de CSCP-proteína heterodimérica dentro de la célula hospedadora, (ii) el complejo de CSCP-proteína heterodimérica se transporta a través de la célula hospedadora y (iii) después se presenta sobre la superficie de la célula hospedadora;

(b) poner en contacto la célula hospedadora con una molécula de detección, en donde la molécula de detección se une al segundo sitio en la proteína heterodimérica, en donde la molécula de detección comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT; y

(c) seleccionar la célula hospedadora que se une a la molécula de detección.

También se divulga un método para detectar y aislar células que producen una proteína de interés (POI) secretada, que comprende: a) construir una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de captura de la superficie celular capaz de unirse a una POI; b) transfectar una célula que expresa la POI con la molécula de ácido nucleico de la etapa a); c) detectar la POI presentada en la superficie poniendo en contacto las células con una molécula de detección, en donde la molécula de detección se une a la POI; y d) aislar células basándose en la molécula de detección.

La proteína de interés es una proteína heterodimérica. En diversas realizaciones, la proteína de interés incluye un ligando, una proteína receptora soluble, un factor de crecimiento, una proteína de fusión, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un Fab, un anticuerpo monocatenario (scFv) o un fragmento del mismo. Cuando la proteína de interés es un anticuerpo, el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en IgM, IgG, IgA, IgD o IgE, así como diversos subtipos o variantes de estos. En una realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo anti-DII4, un anticuerpo anti-ErbB3, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo biespecífico con especificidad dual anti-ErbB3/EGFR o un anticuerpo anti-receptor de IL-6.

En realizaciones más específicas, la proteína de interés es un factor de crecimiento seleccionado entre el grupo que consiste en interleucina (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, factor neurotrófico ciliar (CNTF), eritropoyetina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina 1 (Ang-1),

angiopoyetina 2 (Ang-2), TNF, interferón gamma, GM-CSF, TGF β y receptor de TNF.

En diversas realizaciones, la proteína de interés comprende un dominio variable de un receptor de linfocitos T. En realizaciones específicas, la proteína de interés es un receptor de linfocitos T soluble (sTCR) o una proteína que comprende un dominio extracelular de receptor de linfocitos T fusionado a un Fc (TCR-Fc). En una realización específica, el Fc es un Fc humano. En diversas realizaciones, la proteína comprende un dominio variable de un dominio extracelular de un receptor de linfocitos T. En diversas realizaciones, la proteína comprende un dominio variable y una región constante de un dominio extracelular de un receptor de linfocitos T.

10 El ácido nucleico que codifica la proteína de interés puede ser de cualquier fuente, de origen natural o construido mediante tecnología recombinante y puede seleccionarse entre una biblioteca de ADN.

15 La molécula de captura de la superficie celular es una proteína de captura de la superficie celular (CSCP), que es una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a antígeno y un dominio de anclaje a la membrana, en donde la célula expresa la proteína heterodimérica, en donde la proteína heterodimérica comprende múltiples subunidades y un primer sitio en la proteína heterodimérica reside en una primera subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre que tiene un resto de histidina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un segundo sitio en la proteína heterodimérica se encuentra en una segunda subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT, en donde la CSCP comprende un scFv capaz de unirse a la primera subunidad pero no a la segunda subunidad de la proteína heterodimérica y en donde (i) la CSCP se une al primer sitio en la proteína heterodimérica para formar un complejo de CSCP-proteína heterodimérica dentro de la célula hospedadora, (ii) el complejo de CSCP-proteína heterodimérica se transporta a través de la célula hospedadora y (iii) después se presenta sobre la superficie de la célula hospedadora.

[Eliminado]

30 La proteína de interés es una proteína heterodimérica que tiene una primera subunidad y una segunda subunidad, la molécula de captura de la superficie celular comprende un scFv capaz de unirse a la primera subunidad y no a la segunda subunidad o dicha molécula de captura de la superficie celular se une a la segunda subunidad y no a la primera subunidad.

35 En diversas realizaciones donde la proteína de interés es una IgG1, IgG2, IgG4 o un anticuerpo biespecífico que tiene un dominio CH3 que comprende una mutación que suprime la unión a la proteína A y el otro dominio CH3 capaz de unirse a la proteína A; o una proteína de fusión que comprende una región Fc de IgG1, IgG2, IgG4 o una región Fc que tiene un dominio CH3 que comprende una mutación que suprime la unión a la proteína A y el otro dominio CH3 capaz de unirse a la proteína A, la molécula de captura de la superficie celular comprende un scFv anti-inmunoglobulina, que es un anti-Fc.

45 Los métodos de la invención comprenden además un anclaje de membrana que sirve para anclar la POI a la membrana celular, expuesto en el exterior de la célula y por tanto, funciona como una molécula de captura de la superficie celular. En realizaciones específicas, el anclaje de membrana es un anclaje transmembrana o un enlace de GPI. Los ejemplos de anclajes transmembrana específicos incluyen el dominio transmembrana de un receptor de Fc, tal como el dominio transmembrana de Fc γ RI humano, citándose un ejemplo de este en la SEQ ID NO: 17. El anclaje de membrana puede ser nativo en la célula, recombinante o sintético.

50 También se divulgan casos donde la proteína de interés comprende una región variable de receptor de linfocitos T y la molécula de captura de la superficie celular comprende un antígeno asociado a membrana. En un caso específico, el antígeno asociado a membrana es una proteína de fusión recombinante que comprende un antígeno que puede ser reconocido por la región variable del receptor de linfocitos T fusionado a un anclaje de membrana, en donde el antígeno está asociado con la superficie celular. En un caso específico, la proteína de fusión recombinante comprende un antígeno fusionado a un anclaje transmembrana o a un enlace de GPI. En otro caso específico, la molécula de captura de la superficie celular comprende una proteína de fusión recombinante que comprende un anclaje de membrana y un antígeno que es capaz de unirse a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, antígenos tumorales y proteínas propias de fenotipo transformado.

60 En realizaciones adicionales, se añade una secuencia de señal al extremo amino de una POI, de tal forma que la proteína se transporta a la superficie celular y funciona como una molécula de captura de la superficie celular. La secuencia de señal puede ser nativa para la célula, recombinante o sintética.

65 En diversas realizaciones, se añade una molécula de bloqueo que se une a la molécula de captura de la superficie celular para reducir la difusión de la POI desde la célula expresora hasta una célula vecina. En otra realización, la difusión de la POI desde la célula expresora hasta una célula vecina y su adherencia a esa célula se reduce aumentando la viscosidad del medio.

5 La célula aislada mediante los métodos de la invención puede ser una célula productora de anticuerpo fusionada a una célula inmortalizada. En realizaciones más específicas, la célula productora de anticuerpos es un linfocito B o un derivado del mismo. Un derivado de linfocito B puede ser una célula plasmática, un hibridoma, un mieloma o una célula recombinante.

10 Además, los métodos de la invención son útiles para la identificación de linfocitos B y derivados de los mismos o hibridomas que expresan anticuerpos secretados de una especificidad, afinidad o isotipo deseado. La invención también puede usarse para el aislamiento de células que expresan niveles deseados de un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo.

15 La detección de las células con la POI presentada se logra mediante el uso de una molécula de detección que se une al segundo sitio en la proteína heterodimérica, en donde la molécula de detección comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT.

20 También se divulga un método para detectar y aislar células que producen una proteína de interés (POI) secretada, que comprende: a) transfectar una célula con un ácido nucleico que codifica una molécula de captura de la superficie celular, en donde la molécula de captura de la superficie celular es capaz de unirse a la POI; b) transfectar la célula de a) simultáneamente o posteriormente con un segundo ácido nucleico que codifica una POI, en donde la POI se expresa y se secreta; c) detectar la POI presentada en la superficie poniendo en contacto la célula con una molécula de detección, que se une a la POI; y d) aislar células basándose en la molécula de detección.

25 También se divulga un método para detectar y aislar células que producen una POI, que comprende: a) detectar una célula que expresa una molécula de captura de la superficie celular con alto rendimiento; b) aislar y cultivar la célula detectada en (a); c) transfectar la célula en (b) con un ácido nucleico que codifica una POI, en donde dicha POI es secretada; d) detectar la POI presentada en la superficie poniendo en contacto las células con una molécula de detección que se une a la POI; y e) aislar células basándose en la molécula de detección.

30 También se divulga un método para detectar y aislar células que producen altos niveles de la proteína de interés (POI), que comprende: a) transfectar células con un ácido nucleico que codifica dicha molécula de captura de la superficie celular capaz de unirse a la POI, en donde la célula expresa la POI; b) detectar una célula de (a) que expresa dicha molécula de captura de la superficie celular con alto rendimiento; c) aislar y cultivar una célula con alto rendimiento; d) detectar la POI presentada en la superficie poniendo en contacto la célula con una molécula de detección que se une a la POI; y e) aislar la célula detectada.

35 También se divulga un método para detectar y aislar células que producen altos niveles de una proteína heterodimérica, que comprende: (a) transfectar células con un ácido nucleico que codifica una molécula de captura de la superficie celular, que es una proteína de fusión que comprende un dominio de anclaje a la membrana y es capaz de unirse a una primera subunidad de la proteína heterodimérica, en donde la célula expresa la proteína heterodimérica; (b) detectar una célula de (a) que expresa la molécula de captura de la superficie celular con alto rendimiento; (c) aislar y cultivar la célula que expresa la molécula de captura de la superficie con alto rendimiento; (d) detectar la proteína heterodimérica en la superficie de la célula aislada y cultivada de la etapa (c) con una molécula de detección que se une a la segunda subunidad de la proteína heterodimérica; y (e) aislar la célula detectada en la etapa (d) que porta la proteína heterodimérica detectada en su superficie.

40 También se divulga un método para detectar y aislar células que producen altos niveles de una inmunoglobulina, que comprende: (a) transfectar células con un ácido nucleico que codifica una molécula de captura de la superficie celular capaz de unirse a la inmunoglobulina, en donde la célula expresa la inmunoglobulina; (b) detectar una célula de (a) que expresa la molécula de captura de la superficie celular con alto rendimiento; (c) aislar y cultivar la célula que expresa la molécula de captura de la superficie con alto rendimiento; (d) detectar la inmunoglobulina en la superficie de la célula aislada y cultivada de la etapa (c) con una molécula de detección que se une a la inmunoglobulina; y (e) aislar la célula detectada en la etapa (d) que porta la inmunoglobulina detectada en su superficie.

45 También se divulga un método para detectar y aislar células que producen altos niveles de un anticuerpo biespecífico, que comprende: (a) transfectar células con un ácido nucleico que codifica una molécula de captura de la superficie celular, que es una proteína de fusión que comprende un dominio de anclaje a membrana, tal como una proteína de fusión scFv y es capaz de unirse al anticuerpo biespecífico, en donde la célula expresa el anticuerpo biespecífico; (b) detectar una célula de (a) que expresa la molécula de captura de la superficie celular con alto rendimiento; (c) aislar y cultivar la célula que expresa la molécula de captura de la superficie con alto rendimiento; (d) detectar el anticuerpo biespecífico en la superficie de la célula aislada y cultivada de la etapa (c) con una molécula de detección que se une al anticuerpo biespecífico; y (e) aislar la célula detectada en la etapa (d) que porta el anticuerpo biespecífico detectado en su superficie.

50 También se divulga un método para detectar las células que producen un nivel deseado de un agente de afinidad que

comprende una región variable de receptor de linfocitos T (TCR).

También se divulga un método para detectar células que producen un nivel deseado de un TCR-Fc, que comprende:
 5 (a) transfectar células con un ácido nucleico que codifica un receptor de Fc capaz de unirse a un TCR-Fc, en donde la célula expresa un antígeno reconocido por el TCR-Fc; (b) detectar una célula de (a) que expresa el TCR-Fc con alto rendimiento; (c) aislar y cultivar la célula que expresa el TCR-Fc con alto rendimiento; (d) detectar el antígeno en la superficie de la célula aislada y cultivada de la etapa (c) con una molécula de detección; y (e) aislar la célula detectada en la etapa (d) que porta el antígeno detectado en su superficie.

10 En diversas realizaciones, el TCR se selecciona entre un TCR humano y un TCR de roedor, tal como un TCR de rata, ratón o hámster. En una realización específica, el Fc es un Fc humano. En otra realización específica, el Fc es un Fc humano y el receptor de Fc es un receptor de Fc humano de alta afinidad. En una realización específica, el receptor de Fc humano de alta afinidad es un FcγRI humano.

15 [Eliminado].

[Eliminado]

20 También se divulga una proteína de unión a antígeno recombinante que se une a un dominio Fc de IgG1 humana, un dominio Fc de IgG2 humana o un dominio Fc de IgG4 humana o a cualquier proteína que comprenda, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, que codifica un Fc humano. En algunos casos, la proteína de unión a antígeno recombinante se une al polipéptido con una K_d de menos de aproximadamente 40 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

25 En algunos casos, la proteína de unión a antígeno recombinante comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 15 o de una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 16. En un caso, la proteína comprende una CDR-1 de cadena pesada (HCDR-1) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, una HCDR-2 que
 30 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, una HCDR-3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, una CDR-1 de cadena ligera (LCDR-1) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 y una LCDR-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En algunos casos, la proteína comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 15 (algunas de las cuales son idénticas a la SEQ ID NO: 15) y una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos
 35 un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 16 (algunas de las cuales son idénticas a la SEQ ID NO: 16).

[Eliminado].

40 En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno recombinante es una proteína de fusión de scFv, que comprende un dominio variable de cadena pesada con una secuencia que es al menos un 95 % idéntica (o idéntica) a la SEQ ID NO: 15, un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica (o idéntica) a la SEQ ID NO: 16 y un dominio de anclaje de membrana. En una realización, el dominio de anclaje de membrana procede de un receptor de Fc, tal como el dominio transmembrana de la proteína FcγR1 humana, representada por la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 21, que contiene no solo el dominio transmembrana,
 45 sino también el dominio citoplasmático C-terminal (SEQ ID NO: 18). En una realización específica, la proteína de fusión de scFv tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. Las proteínas de unión a antígeno recombinantes, que son proteínas de fusión de scFv, son útiles como CSCP y como DM.

También se divulga un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno del aspecto anterior. En un caso, tal como en el caso donde la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, el polinucleótido codifica la cadena ligera. De manera análoga, el polinucleótido puede codificar la cadena pesada. En caso de que la proteína de unión a antígeno sea una proteína de fusión de scFv, el polinucleótido puede codificar la proteína de fusión ScFv-FcγRTM-cito de SEQ ID NO: 19. Por ejemplo, el polinucleótido de la SEQ ID NO: 20 codifica la SEQ ID NO: 19.

55 También se divulga un vector de ácido nucleico que abarca el polinucleótido del aspecto anterior. En un caso, el vector comprende el polinucleótido, que codifica la proteína de unión a antígeno, unido operativamente a un promotor cadena arriba y seguido de una secuencia de poliadenilación cadena abajo. El promotor puede ser cualquier promotor, tal como, por ejemplo, un promotor de CMV. Por tanto, en un caso, el vector puede contener la secuencia de la SEQ ID NO: 25. En un caso, el vector puede contener una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección, tal como, por ejemplo, resistencia a la neomicina. En una realización, el vector puede contener una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de transferencia de energía, tal como proteína fluorescente verde (GFP) o un derivado de la misma, tal como proteína fluorescente amarilla (YFP). Por tanto, en un caso, el vector puede contener la secuencia de la SEQ ID NO: 24.

65 El vector puede ser circular o lineal, episómico con respecto al genoma de una célula hospedadora o estar integrado en el genoma de la célula hospedadora. En algunos casos, el vector es un plásmido circular, que en una realización

específica tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 23 para el polinucleótido que codifica ScFv-FcγR-TM-cito, en otro caso específico comprende la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica la cadena pesada y otra realización específica más comprende la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo. En algunos casos, el vector es una construcción lineal, que puede integrarse en un cromosoma de la célula hospedadora. En un caso específico, la construcción lineal tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 22 para el polinucleótido que codifica ScFv-FcγR-TM-cito. En otro caso específico, la construcción lineal comprende la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo. En otro caso específico más, la construcción lineal comprende la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

La célula hospedadora puede ser cualquier célula, procariota o eucariota. Sin embargo, en una realización específica, la célula hospedadora es una célula CHO, tal como una célula CHO-K1.

También se divulga una célula hospedadora que expresa la proteína de unión a antígeno del aspecto anterior y/o contiene el polinucleótido o el vector de ácido nucleico de los aspectos anteriores. En algunos casos, la célula hospedadora es una célula CHO. En una realización específica, la célula hospedadora es una célula CHO-K1. En un caso, la célula hospedadora se usa en la producción de una proteína de interés y la proteína de unión a antígeno se usa como una proteína de captura de la superficie celular de acuerdo con los métodos divulgados en la presente solicitud.

En un caso, la invención proporciona una célula hospedadora útil en la producción de una proteína de interés. La célula hospedadora porta un polinucleótido o vector de ácido nucleico de un aspecto anterior y produce una proteína de unión a antígeno de un aspecto anterior, que sirve como proteína de captura de la superficie celular. La proteína de captura de la superficie celular se une a la proteína de interés dentro de la célula hospedadora y se transporta a través del aparato secretor de la célula y se expresa en la superficie de la célula hospedadora. Por lo tanto, en una realización, la célula hospedadora comprende una proteína de captura de la superficie celular posicionada en la membrana plasmática de la célula hospedadora, con el resto de captura orientado hacia el exterior de la célula. En un caso, la molécula de captura de la superficie celular está unida a una proteína de interés, que está posicionada en la membrana plasmática y está orientada hacia el exterior de la célula.

En una realización, la célula hospedadora produce o es capaz de producir una proteína de fusión de scFv que se une a una proteína de interés que contiene un dominio Fc, que contiene una histidina en la posición 95 de IMGT y una tirosina en la posición 96 de IMGT. Los ejemplos incluyen proteínas de IgG1, IgG2 e IgG4. En una realización, la proteína de fusión de scFv contiene las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:28, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:30 y la SEQ ID NO:31. En una realización específica, la proteína de fusión de scFv comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En una realización específica, la célula hospedadora comprende una proteína de captura de la superficie celular posicionada en la membrana plasmática y unida a una IgG1, IgG2 o IgG4 o un anticuerpo biespecífico que contiene al menos una cadena de una IgG1, IgG2 o IgG4 y que puede tener una segunda cadena pesada que es de otro tipo o contiene una o más sustituciones de aminoácidos.

También se divulga una proteína de unión a antígeno recombinante que se une a un polipéptido de CH3 sustituido que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en (a) 95R y (b) 95R y 96F de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT o (a') 435R y (b') 435R y 436F de acuerdo con el sistema de numeración de EU o cualquier proteína que comprende, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, que codifica un Fc humano sustituido (también conocido como Fc*). En algunos casos, la proteína de unión a antígeno recombinante se une al polipéptido con una K_D de menos de aproximadamente 60 nM medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En algunos casos, la proteína de unión a antígeno recombinante comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 38 o de una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 39. En un caso, la proteína comprende una CDR-1 de cadena pesada (HCDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, una HCDR-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una HCDR-3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una CDR-1 de cadena ligera (LCDR-1) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una LCDR-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36. En algunos casos, la proteína comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 38 (algunas de las cuales son idénticas a la SEQ ID NO: 38) y una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 39 (algunas de las cuales son idénticas a la SEQ ID NO: 39).

En algunos casos, la proteína de unión a antígeno recombinante es un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera. La cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica (o un 100 % idéntica) a la SEQ ID NO: 40. La cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica (o un 100 % idéntica) a la SEQ ID NO: 41. Las proteínas de unión a antígeno recombinantes, que son anticuerpos, se usan como moléculas de detección (DM).

En algunos casos, la proteína de unión a antígeno recombinante es una proteína de fusión de scFv, que en algunos casos comprende un dominio variable de cadena pesada con una secuencia que es al menos un 95 % idéntica (o idéntica) a la SEQ ID NO: 38, un dominio variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica (o idéntica) a la SEQ ID NO: 39 y un dominio de anclaje de membrana. En un caso, el dominio de anclaje de membrana procede de un receptor de Fc, tal como el dominio transmembrana de la proteína FcγR1 humana, representada por la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 21, que contiene no solo el dominio transmembrana, sino también el dominio citoplasmático C-terminal de la SEQ ID NO: 19. En un caso específico, la proteína de fusión de scFv tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43. Las proteínas de unión a antígeno recombinantes, que son proteínas de fusión de scFv, son útiles como CSCP y como DM.

También se divulga un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno del aspecto anterior. En una realización, tal como en el caso donde la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, el polinucleótido codifica la cadena ligera, tal como, por ejemplo, la cadena ligera de la SEQ ID NO: 41. De manera análoga, el polinucleótido puede codificar la cadena pesada, tal como, por ejemplo, la cadena pesada de SEQ ID NO: 40. En caso de que la proteína de unión a antígeno sea una proteína de fusión de scFv, el polinucleótido puede codificar la proteína de fusión ScFv-FcγR-TM-cito de SEQ ID NO: 43. Los polinucleótidos representativos ejemplares incluyen aquellos polinucleótidos de la SEQ ID NO: 49, 50 y 51, respectivamente.

También se divulga un vector de ácido nucleico que abarca el polinucleótido del aspecto anterior. En un caso, el vector comprende el polinucleótido, que codifica la proteína de unión a antígeno, unido operativamente a un promotor cadena arriba y seguido de una secuencia de poliadenilación cadena abajo. El promotor puede ser cualquier promotor, tal como, por ejemplo, un promotor de CMV. Por tanto, en un caso, el vector puede contener la secuencia de la SEQ ID NO: 47. En un caso, el vector puede contener una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección, tal como, por ejemplo, resistencia a la neomicina. En una realización, el vector puede contener una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de transferencia de energía, tal como proteína fluorescente verde (GFP) o un derivado de la misma, tal como proteína fluorescente amarilla (YFP). Por tanto, en un caso, el vector puede contener la secuencia de la SEQ ID NO: 46.

El vector puede ser circular o lineal, episómico con respecto al genoma de una célula hospedadora o estar integrado en el genoma de la célula hospedadora. En algunos casos, el vector es un plásmido circular, que en una realización específica tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 44 para el polinucleótido que codifica ScFv-FcγR-TM-cito, en otro caso específico tiene la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica la cadena pesada y otra realización específica más tiene la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo. En algunos casos, el vector es una construcción lineal, que puede integrarse en un cromosoma de la célula hospedadora. En una realización específica, la construcción lineal comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 51 para el polinucleótido que codifica ScFv-FcγR-TM-cito. En otra realización específica, la construcción lineal comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 50 para el polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo. En otro caso específico más, la construcción lineal comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 49 para el polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

La célula hospedadora puede ser cualquier célula, procariota o eucariota. Sin embargo, en una realización específica, la célula hospedadora es una célula CHO, tal como una célula CHO-K1.

También se divulga una célula hospedadora que expresa la proteína de unión a antígeno del aspecto anterior y/o contiene el polinucleótido o el vector de ácido nucleico de los aspectos anteriores. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula CHO. En una realización específica, la célula hospedadora es una célula CHO-K1. En una realización, la célula hospedadora se usa en la producción de una proteína de interés y la proteína de unión a antígeno se usa como una proteína de captura de la superficie celular de acuerdo con los métodos divulgados en la presente solicitud.

También se divulga una célula hospedadora útil en la producción de una proteína de interés. La célula hospedadora porta un polinucleótido o vector de ácido nucleico de un aspecto anterior y produce una proteína de unión a antígeno de un aspecto anterior, que sirve como proteína de captura de la superficie celular. La proteína de captura de la superficie celular se une a la proteína de interés dentro de la célula hospedadora y se transporta a través del aparato secretor de la célula y se expresa en la superficie de la célula hospedadora. Por lo tanto, en un caso, la célula hospedadora comprende una proteína de captura de la superficie celular posicionada en la membrana plasmática de la célula hospedadora, con el resto de captura orientado hacia el exterior de la célula. En un caso, la molécula de captura de la superficie celular está unida a una proteína de interés, que está posicionada en la membrana plasmática y está orientada hacia el exterior de la célula.

En un caso, la célula hospedadora produce o es capaz de producir una proteína de fusión de scFv que se une a una proteína de interés que contiene un dominio Fc, que contiene una arginina en la posición 95 de IMGT y una fenilalanina en la posición 96 de IMGT (Fc*). Los ejemplos incluyen IgG3 y regiones CH3 sustituidas de proteínas IgG1, IgG2 e IgG4. En una realización, la proteína de fusión de scFv contiene las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO:33, la SEQ ID NO:34, la SEQ ID NO:35, la SEQ ID NO: 36 y la SEQ ID NO: 37. En un caso específico, la proteína de fusión de scFv comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43. En un caso

específico, la célula hospedadora comprende una proteína de captura de la superficie celular posicionada en la membrana plasmática y unida a una IgG3 o a una IgG1, IgG2 o IgG4 sustituida, que contiene la arginina en la posición 95 de IMGT y fenilalanina en la posición 96 de IMGT ("Fc*") o un anticuerpo biespecífico que contiene al menos una cadena pesada del tipo Fc* y la otra cadena pesada de la IgG1, IgG2 o IgG4 de tipo silvestre.

5 También se divulga un método para detectar, aislar o enriquecer respecto de una célula que expresa de manera estable una proteína de interés (POI). El método incluye la etapa de expresar en la célula hospedadora una proteína de captura de la superficie celular (CSCP) y una POI. De acuerdo con este método, la CSCP se une a un "primer sitio" en la POI para formar un complejo de CSCP-POI dentro de la célula hospedadora. El complejo de CSCP-POI se transporta posteriormente a través del sistema secretor de la célula hospedadora y se secreta de la célula. Ya que la CSCP contiene un dominio de unión a membrana (por ejemplo, la SEQ ID NO: 17), el complejo de CSCP-POI se muestra en la superficie de la célula hospedadora, con la POI expuesta en el exterior de la célula. De acuerdo con el método, la célula hospedadora se pone en contacto posteriormente con una molécula de detección (DM), que se une a un "segundo sitio" en la POI. Aquellas células que se unen a la DM se seleccionan para su identificación, aislamiento, agrupamiento y/o enriquecimiento. En una realización, la célula hospedadora unida a la DM se selecciona mediante clasificación celular activada por fluorescencia.

En un caso, el método también incluye la etapa de poner en contacto la célula con una molécula de bloqueo antes de seleccionar la célula hospedadora. La molécula de bloqueo se une a cualquier CSCP que no esté unida a la POI. La molécula de bloqueo no se une al complejo de CSCP-POI.

La POI contiene múltiples subunidades, tales como un anticuerpo que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. El primer sitio en la POI reside en una primera subunidad y el segundo sitio en la POI reside en una segunda subunidad. La POI es una proteína heterodimérica. Cuando la POI es un anticuerpo, el primer sitio en la POI reside en una primera cadena pesada y el segundo sitio en la POI puede residir en una segunda cadena pesada. El anticuerpo comprende múltiples subunidades y un primer sitio en el anticuerpo reside en una primera subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre que tiene un resto de histidina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un segundo sitio en el anticuerpo se encuentra en una segunda subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT. En este caso, la molécula de detección (DM) puede estar marcada.

35 Cuando la POI es un anticuerpo biespecífico, el primer sitio reside en una cadena pesada que tiene un dominio CH3 que contiene un resto de histidina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT (Fc). Por tanto, el segundo sitio puede residir en una cadena pesada que tiene un dominio CH3 que contiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT (Fc*). En este caso, la CSCP puede ser una proteína de unión a antígeno descrita en el aspecto anterior, tal como una proteína de fusión de scFv que contiene las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:28, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:30 y la SEQ ID NO:31; que en una realización específica comprende la SEQ ID NO: 19. Asimismo, en este caso, la molécula de detección (DM) puede comprender una proteína de unión a antígeno recombinante marcada descrita en un aspecto anterior, tal como un anticuerpo o una molécula de scFv que contiene las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO:33, la SEQ ID NO:34, la SEQ ID NO:35, la SEQ ID NO:36 y la SEQ ID NO:37; que en una realización específica comprende o bien la SEQ ID NO: 40 y la SEQ ID NO: 41 (anticuerpo anti-Fc*) o la SEQ ID NO: 43 (scFv*). En este caso, la molécula de bloqueo puede ser un polipéptido de Fc (por ejemplo, monocatenario), tal como hFc o cualquier molécula que pueda unirse a la CSCP sin también unirse a la DM. En una realización, la molécula de detección puede ser un F(ab')₂ marcado anti-IgG humana.

[Eliminado]

También se divulga un método para detectar o aislar una célula que expresa de manera estable una proteína heterodimérica que comprende las etapas de (a) expresar en una célula hospedadora una proteína de captura de la superficie celular (CSCP) y una proteína heterodimérica, en donde (i) la CSCP se une a un primer sitio en la proteína heterodimérica para formar un complejo de CSCP-proteína heterodimérica dentro de la célula hospedadora, (ii) el complejo de CSCP-proteína heterodimérica se transporta a través de la célula hospedadora y (iii) después se presenta sobre la superficie de la célula hospedadora; (b) poner en contacto la célula hospedadora con una molécula de detección, en donde la molécula de detección se une a un segundo sitio en la proteína heterodimérica; y (c) seleccionar la célula hospedadora que se une a la molécula de detección. En algunos casos, la proteína heterodimérica comprende múltiples subunidades y el primer sitio en la proteína heterodimérica reside en una primera subunidad y el segundo sitio reside en la proteína heterodimérica en una segunda subunidad. En algunos casos, la molécula de captura de la superficie celular comprende un antígeno, proteína A o scFv capaz de unirse a la primera subunidad y no a la segunda subunidad.

También se divulga un método para producir un anticuerpo biespecífico que comprende la etapa de expresar en una célula hospedadora una proteína de captura de la superficie celular ("CSCP"), una cadena ligera de anticuerpo, una primera cadena pesada de anticuerpo, que contiene un dominio CH3 que comprende una histidina en la posición 95 de IMGT y una tirosina en la posición 96 de IMGT y una segunda cadena pesada de anticuerpo, que contiene un dominio CH3 que comprende una arginina en la posición 95 de IMGT y una fenilalanina en la posición 96 de IMGT. Mientras que está dentro de la célula hospedadora, la CSCP se une a la primera cadena pesada del anticuerpo, pero no se une a la segunda cadena pesada del anticuerpo, la segunda cadena pesada del anticuerpo se une a la primera cadena pesada del anticuerpo y las cadenas ligeras se unen a las cadenas pesadas, formando de este modo un complejo ternario de CSCP-anticuerpo. Este complejo ternario se secreta y presenta en la superficie de la célula hospedadora. La célula hospedadora puede ponerse en contacto con una molécula de bloqueo, que se une a una CSCP en la superficie celular, pero solo en aquellas situaciones en las que la CSCP no está unida al anticuerpo de interés, es decir, una CSCP "vacía". Después, se pone en contacto la célula hospedadora con una DM que se une o que es capaz de unirse a la segunda cadena pesada de anticuerpo. La célula hospedadora que se une a la DM se identifica, selecciona y/o agrupa. En algunas realizaciones, las células hospedadoras que se unen a la DM se seleccionan, agrupan, cultivan y expanden y después, se someten a otra ronda de expresión, detección, selección, agrupamiento y expansión. Este proceso puede reiterarse múltiples veces para enriquecer para la producción de altos títulos de anticuerpos biespecíficos.

En una realización, la CSCP empleada en el método es una proteína de fusión de scFv que contiene las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO:28, la SEQ ID NO:29, la SEQ ID NO:30 y la SEQ ID NO:31. En una realización, la CSCP comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19. En una realización, la DM empleada en el método es una proteína que contiene las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO:33, la SEQ ID NO:34, la SEQ ID NO:35, la SEQ ID NO:36 y la SEQ ID NO:37. En una realización, la DM es un anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 40 y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 41. En otra realización, la DM es una proteína de fusión de scFv que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43. Puede unirse un marcador, por ejemplo, un resto fluorescente tal como FITC o Alexa Fluor® 488, a la DM. Puede usarse clasificación celular activada por fluorescencia como medios de detección y selección.

[Eliminado]

[Eliminado]

La célula hospedadora, que es el producto de la selección, el agrupamiento y la expansión iterativos, puede ser capaz de producir o produce anticuerpo biespecífico a un título de al menos 2 g/l, en donde la especie de anticuerpo biespecífico (Fc/Fc*) representa al menos un 40 % en masa del anticuerpo total producido por la célula hospedadora (Fc/Fc + Fc*/Fc* + Fc/Fc*).

Otros objetos y ventajas resultarán evidentes a partir de una revisión de la descripción detallada adjunta.

40 Descripción detallada

[Eliminado]

Como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a "un método" incluye uno o más métodos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que resultarán evidentes para los expertos en la materia tras leer la presente divulgación y así sucesivamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

55 Descripción general

El método de la invención proporciona ventajas sustanciales frente a los métodos actuales para el aislamiento y la identificación de células secretoras de proteína. Por ejemplo, las células que secretan anticuerpos pueden aislarse rápida y convenientemente basándose en la especificidad, la avidéz o el isotipo deseado. Además, puede cuantificarse directamente la cantidad de proteína secretada producida, a diferencia de muchos métodos de la técnica anterior, en donde se cuantifica indirectamente la producción de proteína secretada.

Recientemente, se han desarrollado dos métodos adicionales que utilizan citometría de flujo para el aislamiento de alto rendimiento de líneas celulares con alta expresión estable. El primer método implica la modificación del plásmido de expresión para incluir una lectura transcripcional del ARNm del GOI. Esto se logra en la mayoría de casos insertando

un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) y un gen cuyo producto de proteína se monitoriza fácilmente mediante citometría de flujo, en la mayoría de casos proteína fluorescente verde (GFP), entre el codón de parada del GOI y el sitio de poli A terminal (Meng et al. (2000) Gene 242:201). La presencia de un IRES permite que se traduzcan la POI y la GFP a partir del mismo ARNm. Por lo tanto, el nivel de expresión del gen de GFP está relacionado indirectamente con el nivel de ARNm del GOI. Los clones que acumulan la GFP a altos niveles se aíslan mediante citometría de flujo y después se someten a detección sistemática para la producción de la POI. Debido a que este método depende del acoplamiento de la expresión del GOI al gen indicador mediante el uso de un IRES en una construcción recombinante, no es aplicable al aislamiento de hibridomas.

El uso de citometría de flujo en el aislamiento de clones de expresión permite el análisis rápido de grandes números de clones en un formato de alto rendimiento. Además, el uso de citometría de flujo reduce significativamente la manipulación directa de las células. Desafortunadamente, el nivel de producción de GFP no es una medida directa del nivel de producción de la POI. Varios mecanismos pueden desacoplar la producción de la POI secretada de la acumulación de GFP. Las diferencias en la producción de la POI y el indicador de GFP puede ser el resultado de diferencias en la eficiencia de traducción de los dos genes, la eficiencia de la secreción de la POI o la estabilidad del ARNm policistrónico.

Otro método que usa citometría de flujo para aislar clones de expresión implica la encapsulación de células dentro de microgotas de agarosa (Weaver et al. (1990) Methods Enzymol. 2:234). En este método, se unen anticuerpos biotinilados específicos para la POI a la agarosa biotinilada mediante estreptavidina, de tal forma que la POI secretada se captura y retiene dentro de la microgota (Gray et al., (1995) J. Immunol. Methods 182:155). La POI atrapada se detecta mediante inmunotinción con un anticuerpo específico para la POI. Para reducir la cantidad absorbida por la agarosa de encapsulación de la POI secretada por células adyacentes, las células se colocan en un medio de baja permeabilidad. Aquellas células con la máxima tinción con anticuerpo de la POI en la agarosa de inclusión se identifican y aíslan mediante citometría de flujo. La estrategia de microgotas de gel detecta sistemáticamente las células por su capacidad para secretar la POI, en lugar de detectar sistemáticamente la expresión de ARNm del GOI, pero requiere de la disponibilidad de anticuerpos adecuados para atrapar y teñir la POI secretada y el procedimiento necesita equipos especiales para generar las microgotas de gel de agarosa. Además, algunas células pueden ser sensibles al proceso de encapsulación.

Una variación de este método evita la necesidad de incluir las células en una matriz mediante unión directa de un anticuerpo, específico para la POI, a la superficie celular (Manz et al. (1995) PNAS 92:1921-1925). En este método, la biotinilación no específica de las proteínas de la superficie celular con biotina-éster de hidroxisuccinimida va seguida de la puesta en contacto con un anticuerpo conjugado a estreptavidina capaz de unirse a la POI. Las células que secretan la POI quedan decoradas con la POI, que después se detecta con un segundo anticuerpo marcado de manera adecuada. Sin embargo, la difusión de la POI entre células vecinas es problemática y este método también requiere un medio de alta viscosidad para reducir la difusión de la POI desde las células de expresión. Debido a que se necesitan estos medios de alta viscosidad para discriminar las células, las células se tienen que lavar y colocar en un medio adecuado para la clasificación celular, si así se desea.

Los problemas asociados con la identificación y el aislamiento de líneas celulares recombinantes de alta expresión se aplica especialmente al aislamiento de hibridomas que expresan un anticuerpo de interés. Sin embargo, la identificación de hibridomas útiles incluye varios problemas adicionales; han de someterse en primer lugar a detección sistemática de la actividad de unión a antígeno, después para el isotipo de inmunoglobulina. Además, los métodos basados en GFP no son aplicables a la identificación y el aislamiento de hibridomas debido a que la construcción de hibridomas no incluye una construcción recombinante, de tal forma que puede ligarse la expresión de los genes de anticuerpo a un indicador transcripcional, tal como GFP. La detección sistemática de hibridomas es un trabajo lento y laborioso donde el número de clones sometidos a detección sistemática está limitado por las tecnologías existentes.

La presente invención describe un método nuevo y anteriormente desconocido para identificar y aislar células que producen proteínas secretadas. La invención se basa en la producción de una línea celular que expresa una molécula, localizada en la superficie celular, que se une a la POI. La POI presentada en la superficie celular puede detectarse mediante marcaje con diversas moléculas de detección. La cantidad de POI presentada en la superficie celular, en condiciones específicas, es una medida directa de la cantidad total de POI secretada. Después, pueden aislarse los productores de POI de los no productores y pueden diferenciarse los niveles de producción o las características de la POI. La ventaja de la invención es que cuantifica directamente la POI secretada en lugar de medir indirectamente el ARNm.

En particular, la presente invención proporciona un método para detectar y aislar células que producen altos niveles de una proteína heterodimérica que tiene una primera subunidad y una segunda subunidad, comprendiendo el método:

(a) transfectar células con un ácido nucleico que codifica una proteína de captura de la superficie celular (CSCP), que es una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a antígeno y un dominio de anclaje a la membrana, en donde la célula expresa la proteína heterodimérica, en donde la proteína heterodimérica comprende múltiples subunidades y un primer sitio en la proteína heterodimérica reside en una primera subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre que tiene un resto de histidina

en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un segundo sitio en la proteína heterodimérica se encuentra en una segunda subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT, en donde la CSCP comprende un scFv capaz de unirse a la primera subunidad pero no a la segunda subunidad de la proteína heterodimérica y en donde (i) la CSCP se une al primer sitio en la proteína heterodimérica para formar un complejo de CSCP-proteína heterodimérica dentro de la célula hospedadora, (ii) el complejo de CSCP-proteína heterodimérica se transporta a través de la célula hospedadora y (iii) después se presenta sobre la superficie de la célula hospedadora;

(b) detectar una célula de (a) que expresa la CSCP con alto rendimiento;

(c) aislar y cultivar la célula que expresa la CSCP con alto rendimiento;

(d) detectar la proteína heterodimérica en la superficie de la célula aislada y cultivada de la etapa (c) con una molécula de detección que se une al segundo sitio en la proteína heterodimérica, en donde la molécula de detección comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT; y

(e) aislar la célula detectada en la etapa (d) que porta la proteína heterodimérica detectada en su superficie.

La presente invención también proporciona un método para detectar o aislar una célula que expresa de manera estable una proteína heterodimérica que tiene una primera subunidad y una segunda subunidad, comprendiendo el método las etapas de:

(a) expresar en una célula hospedadora:

(i) una proteína de captura de la superficie celular (CSCP) que comprende una proteína de unión a antígeno y un dominio de anclaje a la membrana y

(ii) una proteína heterodimérica, en donde la proteína heterodimérica comprende múltiples subunidades y un primer sitio en la proteína heterodimérica reside en una primera subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre que tiene un resto de histidina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un segundo sitio en la proteína heterodimérica se encuentra en una segunda subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT, en donde la CSCP comprende un scFv capaz de unirse a la primera subunidad pero no a la segunda subunidad de la proteína heterodimérica; y,

en donde (i) la CSCP se une al primer sitio en la proteína heterodimérica para formar un complejo de CSCP-proteína heterodimérica dentro de la célula hospedadora, (ii) el complejo de CSCP-proteína heterodimérica se transporta a través de la célula hospedadora y (iii) después se presenta sobre la superficie de la célula hospedadora;

(b) poner en contacto la célula hospedadora con una molécula de detección, en donde la molécula de detección se une al segundo sitio en la proteína heterodimérica, en donde la molécula de detección comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT; y

(c) seleccionar la célula hospedadora que se une a la molécula de detección.

Por tanto, la presente invención se refiere a la construcción o al uso de células que expresan moléculas de captura de la superficie celular que se unen a diversas POI secretadas en la misma célula que produce la POI. A medida que la célula secreta la POI, estas moléculas de captura de la superficie celular se unen a esta o pueden formarse intracelularmente complejos de la POI y moléculas de captura de la superficie celular y después secretarse. La unión puede producirse de manera autocrina o mientras se está secretando. Las células que producen la POI secretada pueden identificarse y aislarse posteriormente. Dicha identificación y aislamiento puede basarse en características de la POI, la producción de la POI o la ausencia de la misma o por niveles específicos de producción. La molécula de captura de la superficie celular y/o la POI pueden producirse por la célula en su estado nativo o las moléculas de captura de la superficie celular y/o la POI pueden producirse recombinantemente. Mediante la construcción o el uso de dicha célula, puede capturarse cualquier proteína secretada por la molécula de captura de la superficie celular a condición de que haya una afinidad correspondiente entre las dos. Como se explica adicionalmente, puede manipularse cualquier molécula, de tal forma que puede usarse como una molécula de captura de la superficie celular. Por lo tanto, la presente invención puede utilizarse para aislar cualquier célula que secreta una proteína.

La proteína de captura de la superficie celular (CSCP) comprende una proteína de unión a antígeno y un dominio de anclaje a la membrana. Lo que se necesita es la capacidad de la proteína deseada para quedar anclada a la membrana celular y exponerse al espacio extracelular. Si la célula deseada tiene una secuencia de señal, solo se necesita añadir

un anclaje de membrana, incluyendo, pero sin limitación, un anclaje transmembrana o una señal de anclaje a GPI, a la molécula de captura de la superficie celular, de tal forma que queda anclada en la membrana celular expuesta al exterior de la célula. Además, en caso de que la proteína deseada carezca de una secuencia de señal, puede añadirse una secuencia de señal al extremo amino de la proteína deseada, de tal forma que se transporta a la superficie celular.

5 Una secuencia de señal y un anclaje de membrana puede ser nativa para la célula, recombinante o sintética.

Las células normalmente secretan una gran variedad de proteínas, de manera endógena o después de la introducción de ADN recombinante. Puede identificarse cualquier proteína heterodimérica secretada y la célula que la produce puede aislarse de acuerdo con el método de la presente invención. Dichas proteínas secretadas incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento, receptores del factor de crecimiento, ligandos, componentes de receptor solubles, anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, moléculas trampa recombinantes, proteínas de fusión que contienen Fc, sTCR, TCR-Fc y hormonas peptídicas. Dichas proteínas secretadas pueden ser o no recombinantes. Es decir, la secreción de algunas proteínas de interés por la célula deseada puede no requerir la introducción de secuencias de nucleótidos adicionales. Por ejemplo, la secreción de anticuerpos por linfocitos B o células plasmáticas no es el resultado de la introducción de secuencias de nucleótidos recombinantes en el linfocito B o la célula plasmática. Las proteínas recombinantes secretadas pueden producirse mediante técnicas de biología molecular convencionales bien conocidas por el experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Volúmenes 1, 2 y 3, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel et al., Greene Publ. Assoc., Wiley Interscience, NY). Estas proteínas secretadas son útiles para muchos fines comerciales y de investigación. La presente invención abarca la producción de dichas proteínas secretadas mediante las metodologías de la invención. La detección de las células con la POI presentada se logra mediante el uso de una molécula de detección que se une al segundo sitio en la proteína heterodimérica, en donde la molécula de detección comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT. Dichas moléculas de detección pueden facilitar la detección y/o el aislamiento de las células que presentan la POI.

La divulgación es aplicable al aislamiento de, entre otras cosas, a) células productores de ligando mediante el uso del receptor específico de ligando como la molécula de captura de la superficie celular, b) células productoras de receptor soluble usando un ligando específico unido a receptor de la superficie como la molécula de captura de la superficie celular, c) células productoras de anticuerpo usando una proteína de unión a anticuerpo como molécula de captura de la superficie celular, d) sTCR usando una proteína de unión a s-TCR (por ejemplo, un antígeno reconocido por el TCR) como la molécula de captura de la superficie celular, e) TCR-Fc, usando una proteína de unión a Fc como molécula de captura de la superficie celular o f) anticuerpos biespecíficos que portan una mutación en uno de sus dominios CH3 que suprime la unión a proteína A, usando una molécula de captura de la proteína de fusión que comprende un dominio scFv fusionado a un dominio transmembrana y citoplasmático de FcγR.

De acuerdo con la metodología divulgada, en primer lugar se transfecta con un vector que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de captura de la superficie celular que es capaz de unirse a la POI secretada, en condiciones en las que se expresa dicha molécula de captura de la superficie celular. Las células transfectadas que son productoras adecuadas de dichas moléculas de captura de la superficie celular se detectan y aíslan posteriormente y se cultivan dichas células. Estas células pueden producir la POI o bien de manera natural o la POI puede producirse de manera recombinante. En caso de que las células produzcan la POI de manera natural, están listas para la detección y el aislamiento. En caso de que la POI se produzca recombinantemente, las células aisladas y cultivadas que expresan la molécula específica de captura de la superficie celular se transfectan con la segunda secuencia de nucleótidos que codifica la POI secretada, en condiciones en las que se expresa la POI secretada. Tras la expresión, la POI secretada se une a las moléculas de captura de la superficie celular y se detectan y aíslan las células que muestran la POI unida.

En caso de que la POI se produzca de manera natural por la célula, la célula no se transfectará con la secuencia de nucleótidos que codifica la POI. Por lo tanto, este aspecto de la invención es aplicable a cualquiera y a todas las células que producen una POI. Además, en caso de que la molécula de captura de la superficie celular se produzca naturalmente por la célula, no es necesario transfectar la célula con secuencias de nucleótidos que codifican la molécula de captura de la superficie celular. Por lo tanto, este aspecto de la invención es aplicable a cualquiera y a todas las células que producen una molécula de captura de la superficie celular.

Puede transfectarse una gran variedad de células hospedadoras. Estas células pueden ser de origen eucariota o procariota. Las células serán normalmente células eucariotas inmortalizadas y en particular, células de mamífero, por ejemplo, células de riñón de mono (COS), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón embrionario humano (HEK293), leucocitos, mielomas, líneas celulares transfectadas con genes de adenovirus, por ejemplo, AD5 E1, incluyendo, pero sin limitación, células retinales humanas inmortalizadas transfectadas con un gen de adenovirus, por ejemplo, células PER.C6™ y células madre embrionarias. Las células también pueden ser células no de mamífero, incluyendo células bacterianas, fúngicas, de levadura y de insecto, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, especies de *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Todas las células pueden cultivarse en bandejas de medio de cultivo en condiciones adecuadas o en un hospedador sintético. Las células más deseables serán células de

mamífero que puedan cultivarse.

La POI secretada unida a la molécula de captura de la superficie celular se detecta usando una molécula de detección que comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT. Los cultivos de células que muestran la POI secretada pueden ponerse en contacto con la molécula de detección, en donde dichas una o más moléculas pueden contener un marcador de detección, tal como, por ejemplo, un marcador cromogénico, fluorogénico, colorado, fluorescente o magnético. El marcador unido a la molécula de detección puede detectarse y aislarse la célula usando varios métodos. Lo más preferentemente, en una población celular, el marcador se detectará y se aislará la célula usando citometría de flujo. Como alternativa, la molécula de detección puede usarse para el aislamiento directo de células que presentan la POI. Esto puede lograrse mediante conjugación de la molécula de detección a una placa de cultivo, moléculas paramagnéticas o cualquier otra partícula o soporte sólido. Además, la POI presentada puede detectarse directamente mediante una propiedad de la molécula de detección o de la POI.

[Eliminado]

En cualquiera de las realizaciones y con respecto al aislamiento de células expresoras de células no expresoras o células con menor expresión, una de las principales dificultades, cuando la POI es una proteína secretada, es la difusión de la POI entre células vecinas. Por lo tanto, es crítico que cualquier sistema que esté diseñado para capturar la POI secretada en la superficie celular prevenga la difusión de la POI de la célula expresora a una célula vecina y su adherencia a dicha célula. En caso de que se permita que se produzca difusión y de que las células vecinas queden decoradas con la POI secretada, la separación de las células basándose en el grado de decoración de la POI no logrará discriminar células con alta expresión de células con bajos niveles de expresión y no logrará aislar de manera efectiva las células expresoras de las no expresoras.

Por lo tanto, una realización de la presente invención es bloquear la difusión de la POI secretada entre células vecinas. Esto puede lograrse mediante la adición de una molécula de bloqueo que se une o bien a la molécula de captura de la superficie celular o a la POI e impide la unión de la POI secretada a la molécula de captura de la superficie celular. En este aspecto, las moléculas de detección no se unen a la molécula de bloqueo. Por ejemplo, en caso de que el receptor de la superficie celular sea el hFcγRI y la POI secretada posea el fragmento Fc de IgG humana, puede bloquearse la difusión de la POI secretada entre células vecinas mediante la adición de IgG exógena de rata al medio de cultivo. La detección de células que presentan POI secretada y no IgG de rata unida, se logra mediante el uso de anticuerpos específicos para Fc de IgG humana que no reconocen a la IgG de rata. En otra realización, la unión de la POI secretada entre células vecinas se reduce aumentando la viscosidad del medio.

En una realización de la presente invención, no se permite que la POI secretada se acumule en el medio. Esto puede lograrse regulando la expresión de la POI secretada y/o de la molécula de captura de la superficie celular, de tal forma que una breve expresión de la POI da como resultado la unión de suficiente POI a la molécula de captura de la superficie celular, pero cantidades insuficientes para su difusión. En otra realización, pueden retirarse del medio células que contienen POI acumulada, se desprende la POI unida a las células y se permite que continúe la expresión de la POI durante un periodo de tiempo limitado, de tal forma que la POI secretada no se acumula en el medio. Las proteínas pueden desprenderse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, lavando las células con tampón a pH bajo.

De acuerdo con la presente invención, aquellas células en una población que se unen a la mayor cantidad de moléculas de detección también expresan la POI más secretada. De hecho, cuanto mayor sea la cantidad de POI que secreta una célula individual, más cantidad de POI se presenta en la superficie celular. Esta correlación entre la cantidad de POI presentada en la superficie y el nivel de expresión de la POI en dicha célula permite identificar rápidamente células con un nivel de expresión relativo deseado de una población de células.

También se divulga el uso de una biblioteca de ADN para expresar proteína secretada, que puede presentarse en la superficie celular por la molécula de captura de la superficie celular. Por ejemplo, también puede generarse una biblioteca de ADN a partir de las regiones codificantes de los dominios variables de anticuerpo de linfocitos B aislados de animales inmunizados. Después, puede expresarse la biblioteca de ADN en una célula que expresa una molécula de captura de la superficie celular específica para anticuerpos, de tal forma que pueden identificarse y aislarse mediante el método de la invención clones con la especificidad, el isotipo o la avidéz deseados. En otra realización, puede generarse una biblioteca de ADN a partir de las regiones codificantes de los dominios variables de receptores de linfocitos T procedentes de linfocitos T y fusionarse a, por ejemplo, un Fc capaz de unirse a una proteína de unión a Fc. Después puede expresarse la biblioteca de ADN en una célula que expresa una proteína de unión a Fc, de tal forma que pueden identificarse y aislarse como se describe en el presente documento clones con la especificidad, el isotipo o la avidéz deseados.

También se divulga la creación de mamíferos transgénicos que expresan una molécula de captura de la superficie celular particular en uno o más tipos celulares. Las células de dichos mamíferos transgénicos pueden someterse a detección sistemática de la producción de una POI. Por ejemplo, puede ser deseable expresar una molécula de captura

de la superficie celular, específica para anticuerpos, en células plasmáticas. Por consiguiente, pueden recogerse células plasmáticas de ratones inmunizados y pueden aislarse mediante el método de la invención aquellas células que producen anticuerpos específicos para el antígeno deseado.

- 5 En una realización adicional de la invención, la producción de anticuerpo se mide mediante el uso de una línea celular CHO que expresa el receptor Fc γ R1 humano (Fc γ RI) que se une al antígeno particular o a la TCR-Fc que es la POI.

10 En otro aspecto de la invención, la proteína de interés comprende uno o más dominios variables de receptor de linfocitos T o un receptor de linfocitos T soluble. Los uno o más dominios variables del receptor de linfocitos T pueden unirse covalentemente a un resto que puede unirse a una proteína de captura de la superficie celular. En una realización específica, los uno o más dominios variables del receptor de linfocitos T se fusionan a una secuencia de Fc, por ejemplo, una secuencia de Fc humano y la proteína de captura de la superficie celular es un receptor de Fc, por ejemplo, un Fc γ R.

15 Se conocen las estructuras generales de dominios variables de los TCR (véase, por ejemplo, Lefranc y Lefranc (2001) The T Cell Receptor FactsBook, Academic Press; véanse, por ejemplo, las págs. 17-20; véase también, Lefranc et al. (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains, *Developmental and Comparative Immunology* 27:55-77, y Lefranc et al. (2005) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, *Developmental and Comparative Immunology* 29:185-203). En una realización, el dominio variable del TCR de un TCR-Fc comprende una región N-terminal que tiene un dominio variable de 104-125 aminoácidos. En otra realización, el TCR-Fc comprende además una región constante de TCR que comprende 91-129 aminoácidos. En otra realización, el TCR-Fc comprende además un péptido conector que comprende 21-62 aminoácidos.

25 En una realización, la secuencia de Fc está fusionada directamente o a través de un enlazador al dominio variable del TCR. En otra realización, el TCR-Fc comprende una región variable de TCR y una región constante de TCR y la secuencia de Fc se fusiona directamente o a través de un enlazador a la región constante del TCR. En otra realización, el TCR-Fc comprende una región variable de TCR, una región constante de TCR y un péptido conector y la secuencia de Fc se fusiona directamente o a través de un enlazador al péptido conector.

30 El sTCR, TCR-Fc o la proteína de fusión que comprende una o más regiones variables del receptor de linfocitos T puede seleccionarse para que se una específicamente a un antígeno de interés, por ejemplo, una sustancia producida por una célula tumoral, por ejemplo, sustancia de células tumorales que es capaz de producir una respuesta inmunitaria en un hospedador. En una realización específica, el antígeno es un antígeno que está presente en la superficie de una célula tumoral (es decir, un antígeno tumoral), se reconoce por un linfocito T y que produce una respuesta inmunitaria en un hospedador. Los antígenos tumorales incluyen, por ejemplo, alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), MUC-1, antígeno tumoral epitelial (ETA), tirosinasa (por ejemplo, para melanoma maligno), antígeno asociado con melanoma (MAGE) y formas mutadas o anormales de otras proteínas, tales como, por ejemplo, ras, p53, etc.

40 En una realización, la POI es un TCR-Fc y el TCR-Fc comprende una región variable de cadena α de TCR fusionada a una secuencia de Fc y una cadena β de TCR fusionada a la secuencia de Fc (cada una directamente o mediante un enlazador), en donde la fusión de cadena α de TCR-Fc y la fusión de cadena β de TCR-Fc se asocian para formar un $\alpha\beta$ TCR-Fc. En una realización específica, el $\alpha\beta$ TCR-Fc comprende los dos polipéptidos a continuación: (1) una región variable de cadena α de TCR fusionada a una región constante de cadena α de TCR fusionada a una secuencia de Fc y (2) una región variable de cadena β de TCR fusionada a una región constante de cadena β de TCR fusionada a una secuencia de Fc.

50 En otra realización, la POI es un TCR-Fc que tiene una región viable de TCR α y una región variable de TCR β y, opcionalmente, una región constante de TCR α y/o una región constante de TCR β . En una realización específica, el TCR-Fc está codificado por un ácido nucleico que comprende (de 5' a 3') una secuencia de región variable de TCR α , opcionalmente seguida por una secuencia de región constante de TCR α , una secuencia de región variable de TCR β , opcionalmente seguida por una secuencia de región constante de TCR β , opcionalmente un enlazador, después una secuencia de Fc. En una realización específica, el TCR-Fc está codificado por un ácido nucleico que comprende (de 5' a 3') una secuencia de región variable de TCR β , opcionalmente seguida por una secuencia de región constante de TCR β , una secuencia de región variable de TCR α , opcionalmente seguida por una secuencia de región constante de TCR α , opcionalmente un enlazador, después una secuencia de Fc. En diversas realizaciones, las construcciones que codifican TCR-Fc están precedidas de secuencias de señal, por ejemplo, secuencias de señal de secreción, para hacerlas secretables.

60 En otra realización, la POI es un TCR-Fc y el TCR-Fc comprende un TCR-Fc que comprende una cadena γ de TCR fusionada a una secuencia de Fc y una región variable de cadena δ de TCR fusionada a una secuencia de Fc para formar un $\gamma\delta$ TCR-Fc. En una realización específica, el $\gamma\delta$ TCR-Fc comprende los dos polipéptidos a continuación: una región variable de cadena γ de TCR fusionada a una región constante de cadena γ de TCR fusionada a una secuencia de Fc y (2) una región variable de cadena δ de TCR fusionada a una región constante de cadena δ de TCR fusionada a una secuencia de Fc.

Las regiones variables del receptor de linfocitos T pueden identificarse y/o clonarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Las regiones variables del receptor de linfocitos T de la proteína de interés pueden obtenerse, por ejemplo, expresando ADN de la región variable del receptor de linfocitos T reorganizado en una célula, por ejemplo, fusionado a una secuencia de Fc humano. Pueden obtenerse regiones variables de receptor de linfocitos T reorganizadas específicas para un antígeno particular mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica (véanse las referencias más adelante), por ejemplo, exponiendo a un ratón a un antígeno y aislando linfocitos T del ratón, produciendo hibridomas de los linfocitos T del ratón y sometiendo a detección sistemática los hibridomas con el antígeno de interés para obtener un hibridoma de interés. Las regiones variables de linfocitos T reorganizadas específicas para el antígeno de interés pueden clonarse a partir de los uno o más hibridomas de interés. Las regiones variables del receptor de linfocitos T específicas para un antígeno también pueden identificarse usando tecnología de presentación en fagos, por ejemplo, como se proporciona en las referencias más adelante. Posteriormente, pueden clonarse y fusionarse las regiones variables, por ejemplo, a un Fc humano para producir una proteína de interés que puede unirse a una molécula de captura de la superficie celular que es un FcγR.

Se describen métodos para identificar y/o clonar regiones variables de receptores de linfocitos T, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.635.354 (cebadores y métodos de clonación); Genee et al. (1992) An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (Vα1-w29/Vβ1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction, *Eur. J. Immunol.* 22:1261-1269 (cebadores y métodos de clonación); Gorski et al. (1994) Circulating T Cell Repertoire Complexity in Normal Individuals and Bone Marrow Recipients Analyzed by CDR3 Size Spectratyping, *J. Immunol.* 152:5109-5119 (cebadores y métodos de clonación); Johnston, S. et al. (1995) A novel method for sequencing members of multi-gene families, *Nucleic Acids Res.* 23/15:3074-3075 (cebadores y métodos de clonación); Pannetier et al. (1995) T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples, *Immunology Today* 16/4:176-181 (métodos de clonación); Hinz, T. y Kabelitz, D. (2000) Identification of the T-cell receptor alpha variable (TRAV) gene(s) in T-cell malignancies, *J. Immunol. Methods* 246:145-148 (métodos de clonación); van Dongen et al. (2002) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Patente de los Estados Unidos n.º 6.623.957 (métodos de clonación y cebadores); Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936, *Leukemia* 17:2257-2317 (cebadores y métodos de clonación); Hodges et al. (2002) Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes, *J. Clin. Pathol.* 56:1-11 (métodos de clonación); Moysey, R. et al. (2004) Amplification and one-step expression cloning of human T cell receptor genes, *Anal. Biochem.* 326:284-286 (métodos de clonación); Fernandes et al. (2005) Simplified Fluorescent Multiplex PCR Method for Evaluation of the T-Cell Receptor Vβ-Chain Repertoire, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12/4:477-483 (cebadores y métodos de clonación); Li, Y. et al. (2005) Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display, *Nature Biotech.* 23/3:349-354 (cebadores y métodos de clonación); Wlodarski et al. (2005) Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia, *Blood* 106/8:2769-2780 (métodos de clonación); Wlodarski et al. (2006) Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome, *Blood* 108/8:2632-2641 (cebadores y métodos de clonación); Boria et al. (2008) Primer sets for cloning the human repertoire of T cell Receptor Variable regions, *BMC Immunology* 9:50 (cebadores y métodos de clonación); Richman, S. y Kranz, D. (2007) Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors, *Biomolecular Engineering* 24:361-373 (métodos de clonación). Se proporcionan ejemplos de sTCR en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.080.840 y 7.329.731; y, Laugel, B et al. (2005) Design of Soluble Recombinant T Cell Receptors for Antigen Targeting and T Cell Inhibition, *J. Biol. Chem.* 280:1882-1892. En el presente documento se divulgan secuencias de Fc; se proporcionan ejemplos de secuencias de Fc y su uso en proteínas de fusión, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.927.044, concedida a Stahl et al.

En una divulgación adicional, la molécula de captura de la superficie celular está diseñada para acoplarse con y presentar aquellas proteínas de interés que normalmente son incapaces de unirse con suficiente afinidad o de unirse con baja afinidad a una molécula de captura de FcγR. Estas proteínas de interés incluyen moléculas de IgG4 e IgG2. Por lo tanto, se diseñó y construyó una molécula de captura modular basándose en un dominio scFv fusionado a un dominio transmembrana y citoplasmático de FcγR. El dominio scFv procedía de un anticuerpo anti-Fc humano de alta afinidad y contiene un dominio variable de cadena pesada fusionado a un dominio variable de cadena ligera. El FcγR-TM-dominio citoplasmático se usó para posibilitar la inserción y orientación adecuada en la membrana plasmática. La proteína de fusión scFv-FcγR-TM-cito es capaz de unirse a IgG4 y a otras moléculas que contienen Fc, así como a subtipos de IgG2 e IgG1 y aquellas heterodiméricas (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) que comprenden al menos un dominio CH3 de tipo silvestre, en donde el otro dominio CH3 puede contener una sustitución de tipo Fc*.

[Eliminado]

Ejemplos

Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1

Construcción de pTE084. Se construyó pTE084 ligando el fragmento de Xba I de 1.436 pb a partir de pCAE100 que codifica Fc γ RI humano (hFc γ RI; número de referencia de GenBank M21091) en el sitio de Xba I de pRG821. La orientación de hFc γ RI en los plásmidos deseables resultantes del ligamiento se examinó mediante mapeo de restricción con Not I, Pst I, Eco RI y Stu I. pTE084 se diseñó para el alto nivel de expresión de hFc γ RI, el receptor de la superficie celular de alta afinidad para el dominio Fc de IgG humana. Contiene dos casetes de expresión independientes. Un casete es un gen de hFc γ RI impulsado por el promotor CMV-MIE y el segundo casete es el gen de neomicina fosfotransferasa II (*neo^r*), que confiere resistencia a G418, impulsado por el promotor tardío de SV40.

Construcción de un derivado de CHO-K1 que expresa hFc γ RI. Se transfectaron células CHO K1 (4×10^6) con pTE084 usando Lipofectamine™ (Life Technologies; Rockville, MD) siguiendo las sugerencias del fabricante. Las células se colocaron en el medio de cultivo (suero fetal bovino al 10 %, F-12 de Ham al 90 %, L-glutamina 2 mM; todos los reactivos eran de Life Technologies, Rockville, MD) que contenía 500 μ g/ml de G418 (Life Technologies) durante 15 días. Las células que sobrevivieron a la selección con G418 se tripsinizaron, se agruparon y se tiñeron con fragmento Fc de IgG humana conjugado a FITC (FITC-hFc; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Brevemente, las células cultivadas en placas de cultivo de 10 cm se lavaron una vez con suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco (PBS) sin cloruro de calcio y cloruro de magnesio (Life Technologies). Se añadieron tres mililitros de tripsina al 0,25 % (Life Technologies) a cada placa. Las placas se removieron hasta que se desprendieron las células de la placa. Se añadieron inmediatamente diez mililitros de medio de cultivo a cada placa de las células desprendidas. Después, se recogieron las células mediante centrifugación a 1.000 x g durante 4 minutos. Después de retirar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 4 ml de 2 μ g/ml de FITC-hFc diluido en medio de cultivo. Después, se colocaron las células en un agitador de plataforma y se tiñeron durante una hora a temperatura ambiente. Para retirar el FITC-hFc no unido, las células se lavaron dos veces con 20 ml de PBS. Se midió el grado de marcaje con FITC-hFc en las células mediante citometría de flujo en un clasificador celular MOFLO™ (Cytomation; Fort Collins, CO). El FITC-hFc no tiñó a las células CHO K1 precursoras con transfección simulada, pero dio lugar a una distribución de la fluorescencia en el grupo resistente a G418 transfectado con pTE084. El 1 % superior de las células más fluorescentes del grupo seleccionado se colocó en placas de 96 pocillos a razón de 1 célula/pocillo mediante citometría de flujo. Nueve días después, se expandieron 88 clones celulares en las placas de 96 pocillos en placas de 24 pocillos. Después de 3 días, se lavaron las células en pocillos individuales una vez con 1 ml de PBS, se tiñeron con 0,5 ml de 2 μ g/ml de FITC-hFc durante 1 hora, se lavaron dos veces con 1 ml de PBS y se examinó la tinción de la superficie celular en un microscopio de fluorescencia. Se seleccionaron los treinta y tres clones más fluorescentes, se expandieron, y después se sometieron a detección sistemática mediante citometría de flujo.

La difusión de la proteína secretada entre células expresoras y células no expresoras se bloqueó añadiendo IgG: Ya que las células en una línea celular clonal para hFc γ RI expresan un hFc γ RI en la superficie celular, todas poseen la capacidad de unirse a IgG o a proteínas de fusión que consisten en el dominio Fc de la IgG. Debido a que hFc γ RI se une a IgG de diversas especies (van de Winkel y Anderson, 1991), se evaluó la capacidad de un panel de IgG animales para bloquear la unión de una proteína que contenía un marcador de Fc de IgG1 humana (hIgG1) (4SC622) a células que expresan hFc γ RI. 4SC622 es una molécula quimérica que consiste en el dominio extracelular de IL-2R γ fusionado al dominio extracelular de hIL-4R γ que después se fusiona al dominio Fc de hIgG1. En este experimento, los cultivos de RGC1, una línea celular que expresa hFc γ RI seleccionada de células CHO K1 que se han transfectado de manera estable con pTE084, se incubaron con 1 μ g/ml de 4SC622 durante 18 horas en presencia o ausencia de 1 mg/ml de IgG de diferentes especies en una estufa de incubación de cultivo tisular a 37 °C.

La unión a la superficie celular de 4SC622 se determinó mediante citometría de flujo después de teñirse las células lavadas con anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón conjugado con ficoeritrina AG184 (PE-AG184) específico para el componente de hIL-2R γ de 4SC622 (BD Pharmingen; San Diego, CA), siguiendo los procedimientos indicados para la tinción celular con FITC-hFc.

Se observó que la hIgG bloqueó completamente la unión de 4SC622 al hFc γ RI expresado en la superficie de RGC1. Las IgG procedentes de rata, de conejo y de cándido también bloquearon eficazmente la unión, mientras que la IgG de origen bovino y ovino no la bloqueó. La capacidad de la IgG de rata añadida de manera exógena para bloquear la unión de una proteína marcada con Fc de hIgG1 (4SC622) añadida de manera exógena a hFc γ RI de la superficie celular sugiere que la IgG de rata también puede bloquear la transferencia entre células que expresan una proteína marcada con Fc de hIgG1 a diferentes niveles. Para analizar esto, se generaron a partir de RGC1 dos líneas celulares que pueden distinguirse por la presencia o ausencia de la proteína fluorescente verde (EGFP). Brevemente, para marcar las células RGC1 con EGFP, se cotransfectaron 2×10^6 células RGC1 con 0,5 mg de PTE073 que codifica un gen de higromicina B fosfotransferasa impulsado por el promotor de fosfoglicerato cinasa y 5 mg de pRG816-EGFP que codifica el gen de EGFP impulsado por el promotor de CMV-MIE. Las células transfectadas se seleccionaron con 200 μ g/ml de higromicina B (Sigma; St. Louis, MO) durante dos semanas. Las células con fluorescencia verde se aislaron mediante citometría de flujo. Un clon que expresaba EGFP y hFc γ RI, RGC2, se usó en experimentos de mezclado de células. La otra línea celular usada en estos experimentos, RGC4, se generó mediante transfección estable de RGC1 con el plásmido pEE14.1-622. pEE14.1-622 es un plásmido en el que la expresión de 4SC622 está impulsada por el promotor de CMV-MIE e incluye un minigen de glutamina sintetasa, que confiere resistencia al

análogo de sulfóxido de metionina (MSX) y permite la selección de eventos de integración estables. Las células RGC4 expresan hFcγRI en la superficie celular y secretan la proteína marcada con Fc de hIgG1, 4SC622. Se incubó una placa de células mixtas que comprendía un 50 % de células RGC2 y un 50 % de RGC4 con 1 mg/ml de IgG de rata durante 18 horas antes de la tinción con PE-AG184 y después se examinó mediante citometría de flujo. La fluorescencia de EGFP de las células RGC2 muestra que las células RGC2 también se unen a 4SC622 añadida exógenamente (1 µg/ml), indicada por un aumento en la fluorescencia de PE-AG184. RGC4 no emitieron fluorescencia en la selección de EGFP. De manera significativa, la IgG de rata añadida de manera exógena no redujo el porcentaje de células RGC4 con tinción positiva para 4SC622 en la superficie celular, lo que sugiere que la unión de 4SC622 a hFcγRI se produjo mientras las proteínas estaban en tránsito hacia la superficie celular. Cuando se mezclaron células RGC2 y RGC4, la proteína 4SC622 secretada por células RGC4 se acumuló en el medio y se unió a la mayoría de las células RGC2. Sin embargo, la adición de 1 mg/ml de IgG de rata redujo significativamente el porcentaje de células RGC2 que se unieron a 4SC622, lo que demuestra que la IgG de rata bloqueó la transferencia de la proteína marcada con Fc de hIgG1 de células expresoras a células no expresoras.

15 **Ejemplo 2: La fluorescencia de la superficie celular se correlaciona con el nivel de expresión de 4SC622**

Las células RGC1 (4×10^6) se transfectaron con pEE14.1-622 y se obtuvo un grupo de transfectantes estables después de la selección durante 2 semanas en medio formado por suero fetal bovino dializado al 10 %, Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) sin glutamina al 90 %, suplemento GS 1 x y MSX 25 µM (todos los reactivos fueron de JRH Biosciences, Lenexa, KS). La IgG de rata se añadió al medio de cultivo a 1 mg/ml 18 horas antes de la inmunotinción. Las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se tiñeron con 1,5 µg/ml de un fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana (H+L) conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante una hora a temperatura ambiente, siguiendo los procedimientos descritos para la tinción de FITC-hFc en el ejemplo 1. Después, se analizó la tinción celular mediante citometría de flujo. La distribución de la fluorescencia sugirió que el grupo seleccionado contenía células con una gran variedad de niveles de expresión de 4SC622. Las células en el 3 % (grupo R3), el 7-11 % (grupo R5) y el 15-19 % (grupo R7) superior con respecto a su inmunofluorescencia se clasificaron en tres grupos distintos y se expandieron durante 9 días. Se determinó la producción media de 4SC622 por célula para los grupos midiendo los números de células y los niveles de 4SC622 en los medios después de 3 días de crecimiento mediante un ensayo Pandex de base inmunológica (Idexx; Westbrook, ME) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En el ensayo Pandex, se usaron partículas de ensayo de poliestireno Fluoricon recubiertas con anticuerpo específico de cabra anti-cadena g de IgG humana (Sigma) para capturar 4SC622 del medio y un anticuerpo específico anti-Fc de IgG humana conjugado a FITC (Sigma) para detectar 4SC622 unido a las perlas. Se incluyeron cantidades conocidas de 4SC622 purificado en el ensayo para calibración. Se observó que las células en el grupo del 3 %, el 7-11 % y el 15-19 % superior producían 4SC622 a razón de 1,42, 0,36 y 0,22 pg/célula/día, respectivamente. Por lo tanto, había una correlación entre la tinción de 4SC622 en la superficie y la producción de proteína específica. Este resultado sugiere que pueden obtenerse células individuales que expresan 4SC622 a altos niveles aislando células que se tiñeron de manera más brillante por el fragmento F(ab')₂ policlonal anti-IgG (H+L) humana conjugado con FITC.

40 **Ejemplo 3: Aislamiento de clones de expresión en RGC1: Trampa de IL-4**

Para demostrar directamente la eficacia a la hora de generar líneas celulares clonales con producción de proteína secretada a alto nivel mediante la presente metodología, se generaron líneas celulares clonales productoras de 4SC622 a partir de RGC1. Se transfectaron células RGC1 (4×10^6) con pEE14.1-622 y se seleccionaron durante dos semanas con MSX 25 µM para obtener un grupo de transfectantes estables. Las células resistentes a MSX se agruparon e incubaron con 1 mg/ml de IgG humana durante 18 horas, antes de la tinción con PE-AG184. Seis células de la selección del 5 % superior, determinada mediante análisis por citometría de flujo de la tinción de 4SC622, se aislaron y se expandieron. Se determinó la producción de 4SC622 a partir de las seis líneas clonales y se comparó con la producción de 4SC622 de clones obtenidos recogiendo manualmente colonias seleccionadas, seguido de clonación por dilución y amplificación. Un clon procedente de RGC1, RGC4, produjo 4SC622 a 12 pg/célula/día. Este nivel es similar al del mejor productor de 4SC622 aislado recogiendo manualmente y analizando 2.700 clones. Por lo tanto, en comparación con la recogida manual de colonias, la metodología presentada en la presente invención demuestra ser mucho más eficiente en la detección sistemática y la clonación de altos productores.

Trampa de VEGF. Los plásmidos pTE080 y pTE081 codifican los genes para las trampas de VEGF, hVEGF-R1R2 y hVEGF-R1R3. hVEGF-R1R2 es una molécula quimérica que consiste en el primer dominio de Ig de hVEGFR1 fusionado al segundo dominio de Ig de hVEGFR2, que después se fusiona al dominio de hIg1Fc. hVEGF-R1R3 es una molécula quimérica que consiste en el primer dominio de Ig de hVEGFR1 fusionado al segundo dominio de Ig de hVEGFR3, que después se fusiona al dominio hIgG1-Fc. En estos plásmidos, el gen para la trampa de VEGF está impulsado por el promotor de CMV-MIE y un minigen de glutamina sintetasa, que confiere resistencia a MSX, se expresa para la selección de eventos de integración estable. Las células RGC1 se transfectaron con cualquiera de estos plásmidos y se cultivaron en medio que contenía MSX 25 µM durante 2 semanas para seleccionar células en las que el plásmido se ha integrado de manera estable. Las células resistentes a MSX se incubaron con 0,1 µg/ml de IgG2a e IgG3 de ratón durante 18 horas antes de la tinción con 1,5 µg/ml de fragmento F(ab')₂ policlonal anti-IgG humana (H+L) conjugado a FITC. Las células se tiñeron durante 1 hora y después se lavaron dos veces con PBS antes de la citometría de flujo. Las células individuales se seleccionaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos entre el grupo de células cuya fluorescencia se encontraba entre el 1 % superior. Se expandieron las células en pocillos

individuales y se determinó su productividad mediante ensayos Pandex. Los clones derivados de RGC que expresaban tanto hVEGF-R1R2 como hVEGF-R1R3 tenían mayores productividades específicas y se aislaron sometiendo a detección sistemática menos clones en comparación con las colonias resistentes a MSX recogidas manualmente con máxima expresión. Véase la Tabla 1.

5

Tabla 1					
COMPARACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA					
Proteína	Transitoria (µg/ml)	Líneas celulares estables CHO K1 recogidas manualmente		Líneas celulares estables derivadas de RGC1	
		Prod. Esp. (pg/célula/día)	n.º de clones explorados	Prod. Esp. (pg/célula/día)	n.º de clones explorados
4SC622	1,1	12	2700	12	6
hVEGF-R1R2	33	68	190	77	62
hVEGF-R1R3	27	5	100	22,6	42

Ejemplo 4: La proteína marcada con Fc de IgG1 unida a la superficie celular se internaliza por RGC1

Se sabe que hFcγRI induce la internalización de su ligando unido a la superficie celular. Para analizar si las células RGC1 podían internalizar 4SC622 unido a la superficie celular, se añadió 1 µg/ml de 4SC622 a las células RGC1 durante 1 hora y después se procesaron inmediatamente las células para la inmunotinción de 4SC622 con PE-AG184 y análisis por citometría de flujo. El noventa y tres por ciento de las células tuvo tinción positiva para 4SC622 en la superficie celular. Como alternativa, se añadió 1 µg/ml de 4SC622 a las células RGC1 durante 1 hora, después se lavaron las células y se incubaron en medio de cultivo sin 4SC622 con PE-AG184 durante 18 horas. El análisis por citometría de flujo después de la inmunotinción para 4SC622 mostró que un 9 % de las células conservó 4SC622 en la superficie celular. Para caracterizar adicionalmente la pérdida de 4SC622 unida a la superficie, se añadió proteína 4SC622 purificada a los medios de células RGC1 y CHO K1 precursoras, y después se midieron los niveles de 4SC622 en los medios con el paso del tiempo. 4SC622, añadido a 2 µg/ml al medio de cultivo en una placa de 10 cm, fue significativamente menor en medio condicionado para RGC1 después de 3 días de incubación en comparación con el control de CHO K1. Estos resultados demuestran que la concentración de 4SC622 en el medio de cultivo se reduce por la presencia de hFcγRI en la superficie celular. Los resultados sugieren que la reducción de 4SC622 del medio fue el resultado de la internalización del complejo hFcγRI-4SC622. Esta internalización de los complejos de ligando-receptor puede facilitar la eliminación eficaz de toda la 4SC622 de células no expresoras en presencia de IgG de bloqueo durante la etapa de bloqueo de 18 horas.

25

Ejemplo 5: Construcción de líneas celulares CHO K1 con expresión inducible de hFcγRI

Los métodos de secreción de trampa autóloga basados en citometría de flujo (FASTR™) que utilizan el hFcγRI permiten un rápido aislamiento de clones con alta expresión. Sin embargo, si hFcγRI media la renovación de proteínas marcadas con Fc, la producción realizada de la proteína secretada por células que expresan hFcγRI modificado por ingeniería genética podría ser mayor en caso de que se pudiera inhibir la expresión de hFcγRI durante el periodo de producción. Con este fin, se construyó una línea celular CHO K1 en la que se induce la expresión de hFcγRI mediante tetraciclina o el análogo, doxiciclina. En este sistema, en primer lugar se modificaron por ingeniería genética células CHO K1 para que expresasen la proteína represora de tetraciclina (TetR) y hFcγRI se colocó bajo el control transcripcional de un promotor cuya actividad estaba regulada por TetR. Se colocaron dos operadores TetR (TetO) en tándem inmediatamente cadena abajo del promotor/potenciador de CMV-MIE en pTE084 para generar pTE158. La transcripción de hFcγRI a partir del promotor de CMV-MIE en pTE158 se bloqueó mediante TetR en ausencia de tetraciclina o algún otro inductor adecuado. En presencia de inductor, la proteína TetR era incapaz de unirse a TetO y se produjo la transcripción de hFcγRI.

40

Las células CHO K1 se transfectaron con pcDNA6/TR, un plásmido que confiere resistencia a la blasticidina, en el que la expresión de TetR se origina a partir del promotor de CMV-MIE (Invitrogen; Carlsbad, CA). Después de dos semanas de selección con 2,5 µg/ml de blasticidina (Invitrogen), se agruparon los transfectantes estables. Este grupo se transfectó posteriormente con pTE158, un plásmido que confiere resistencia a G418 en el que la expresión de hFcγRI es dependiente de un promotor híbrido de CMV-MIE/TetO. Las células transformadas consecutivamente con pcDNA6/TR y pTE158 se seleccionaron con 400 µg/ml de G418 y 2,5 µg/ml de blasticidina durante 12 días y después se agruparon. El grupo se indujo durante dos días mediante la adición de 1 µg/ml de doxiciclina y después se tiñó con FITC-hFc para identificar las células que expresan hFcγRI. El 5 % superior de células que expresan hFcγRI se recogió como un grupo, se expandió durante 6 días en ausencia de doxiciclina y se tiñeron nuevamente con FITC-hFc para la presencia de hFcγRI. Las células que no se tiñeron para hFcγRI se recogieron y expandieron en medio de cultivo que contenía 1 µg/ml de doxiciclina durante tres días. Después se tiñó el grupo respecto de la presencia de hFcγRI y se aisló mediante citometría de flujo. Las células que expresaban los niveles más elevados de hFcγRI (1 % superior) se seleccionaron en placas de 96 pocillos a razón de una célula por pocillo. Estas células supuestamente contenían células que tenían bajos niveles de expresión no inducidos de FcγR1 y altos niveles inducibles de FcγR1. Después de

50

la expansión, se confirmó la inducción de hFcγRI mediante doxiciclina en 20 clones mediante inmunotinción con FITC-hFc y citometría de flujo. Se seleccionó un clon para su caracterización adicional y se denominó RGC10.

- 5 En ausencia de doxiciclina, RGC10 no expresó niveles detectables de hFcγRI, mientras que se observaron altos niveles de hFcγRI en células que se indujeron con 1 μg/ml de doxiciclina durante tres días. La mediana de fluorescencia de las células RGC10 aumentó en más de 1.000 veces después de la inducción mediante doxiciclina.

Ejemplo 6: Aislamiento de líneas celulares productoras de 4SC622 a partir de RGC10

- 10 Las células RGC10 se transfectaron con pEE14.1-622 y se agruparon las células resistentes a MSX después de la selección con MSX 25 mM durante dos semanas. La expresión de hFcγRI se indujo mediante la adición de 1 μg/ml de doxiciclina al medio de cultivo durante tres días. Se añadió un mg/ml de IgG de rata al medio de cultivo que contenía doxiciclina 18 horas antes de la tinción con fragmento F(ab')₂ anti-IgG (H+L) humana conjugado a FITC y el análisis mediante citometría de flujo. Las células que expresaron los mayores niveles de 4SC622 (1 % superior) se seleccionaron en placas de 96 pocillos a razón de 1 célula por pocillo. Sin la inducción de la expresión de hFcγRI mediante doxiciclina, la tinción con fragmento F(ab')₂ policlonal anti-IgG (H+L) humana conjugado a FITC no logra detectar 4SC622 unido a la superficie celular. Se expandieron sesenta clones en ausencia de doxiciclina. La productividad específica de los 13 mayores productores se determinó mediante el ensayo Pandex. La productividad específica del clon 1C2 fue de 17,8 pg/célula/día, significativamente mejor que la de 12 pg/célula/día observada para la mejor línea celular para 4SC622 aislada anteriormente usando la línea celular RGC1 no regulada para hFcγRI.
- 15
- 20

Ejemplo 7: Las células de mieloma Sp2/0 pueden modificarse por ingeniería genética para expresar una proteína de captura de la superficie celular

- 25 En este ejemplo, se modificó por ingeniería genética la línea celular de mieloma Sp2/0-Ag14 para que expresase hFcγRI de manera estable para demostrar que el método de trampa de secreción autóloga era aplicable a líneas celulares distintas de CHO. Se introdujo el gen para hFcγRI en la célula de mieloma mediante infección retroviral. El plásmido pLXRN (Clontech; Palo Alto, CA), un vector de ADN retroviral en donde puede expresarse un gen de interés a partir del promotor de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Moloney murino (LTR de MoMuSV) cadena arriba, se usó para generar retrovirus que codifica el gen de hFcγRI. El fragmento de Xho I de 1.363 pb de pTE084, que codifica el gen FcγRI humano, se clonó en el sitio de Xho I de pLXRN. Se seleccionó un plásmido en el que la expresión de ADNc de hFcγRI era dependiente de la LTR de MoMuSV y se denominó pTE255.
- 30

- Se generó un retrovirus pantrópico para la expresión de hFcγRI siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. La línea celular empaquetadora GP-293, una línea celular basada en HEK 293 que expresa de manera estable las proteínas víricas gag y pol (Clontech; Palo Alto, CA), se cotransfectó con 10 mg de cada uno de pVSV-G y pTE255. El plásmido pVSV-G permite la expresión de la proteína de la envuelta vírica VSV-que confiere un amplio intervalo de hospedador a las partículas infecciosas.
- 35

- 40 Construcción de Sp2-hFcγRI-4. Se usó el retrovirus pantrópico hFcγRI para infectar 1 x10⁷ células de mieloma Sp2/0-Ag14 (American Type Culture Collection; Manassas, VA) a una multiplicidad de aproximadamente 10 partículas infecciosas por célula. Tres días después de la infección, las células se tiñeron durante 1 hora y después se lavaron dos veces con PBS antes del análisis por citometría de flujo. Aquellas células que expresaban hFcγRI, indicada por FITC-hFc unido, se recogieron como un grupo mediante citometría de flujo. El grupo se expandió durante 13 días y después se tiñó nuevamente con FITC-hFc y se recogieron las células que expresaban hFcγRI como un grupo mediante citometría de flujo. Estas células clasificadas se cultivaron en suero fetal bovino al 10 % y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) al 90 % con 4,5 g/l de glucosa y glutamina 4 mM durante 3 semanas, se tiñeron con FITC-hFc y las células con fluorescencia media en el 1 % superior de la población se clonaron mediante clasificación de células individuales. Después de la expansión, se examinaron 24 clones mediante citometría de flujo para la expresión de hFcγRI, como se ha descrito anteriormente y un clon, Sp2-hFcγRI-4, se seleccionó para su caracterización adicional.
- 45
- 50

μ

- Aislamiento de células Sp2-hFcγRI-4 que expresan proteína 4SC622.** Se transfectaron células Sp2-hFcγRI-4 (1 x 10⁷) con pTE209, un plásmido que permite la expresión constitutiva de 4SC622 a partir del promotor de CMV-MIE y confiere resistencia a la higromicina. Las células transfectadas se colocaron en medio que contenía FCS al 10 %, DMEM al 90 % y 400 μg/ml de higromicina durante 14 días. Las células resistentes a higromicina se incubaron con 1 mg/ml de IgG de conejo durante dieciocho horas antes de la tinción con fragmento F(ab')₂ policlonal anti-IgG humana (H+L) conjugado a FITC. Las células se tiñeron durante 1 hora y después se lavaron dos veces con PBS antes del análisis por citometría de flujo. Las células marcadas se recogieron como un grupo mediante citometría de flujo y después se cultivaron durante 5 días y se clasificaron como se ha descrito anteriormente. Las células del grupo expandido que se unieron a la mayoría del fragmento F(ab')₂ policlonal anti-IgG humana (H+L) conjugado a FITC, el 1 % superior de la población, se clonaron mediante selección de células individuales. Se analizó la producción de 4SC622 de diez clones mediante ELISA y se observó que los 10 clones expresaban 4SC622; el clon 5H11 produjo 4SC622 a razón de 0,5 pg por célula por día. Estos datos demostraron que los clones que secretan 4SC622 se aislaron
- 55
- 60
- 65

eficazmente mediante el método de trampa de secreción autóloga a partir de un grupo heterogéneo de células procedentes de la transfección estable de células Sp2-hFcγRI-4 con pTE209.

5 Para confirmar que 4SC622 se presentaba de manera autóloga en la superficie de células de mieloma que expresan tanto 4SC622 como hFcγRI, se incubó el clon 5H11 con 1 mg/ml de IgG de conejo durante 18 horas y después se tiñó con fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana (H+L) conjugado a FITC y se observó que mostraba 4SC622 en la superficie celular. La proteína secretada se presentó en condiciones en las que se bloqueó la alimentación cruzada mediante IgG de conejo, lo que demuestra la presentación autóloga de 4SC622. Estos datos indicaron que el método de trampa de secreción autóloga descrito anteriormente no se limitó a células CHO y que también puede extenderse a células de mieloma y de otros tipos.

Ejemplo 8. La proteína G quimérica puede funcionar como proteína de captura de la superficie celular

15 Para demostrar la aplicación del método de trampa de secreción autóloga a una proteína de captura de la superficie celular distinta de hFcγRI, se construyó una línea celular que expresa proteína G. La proteína g, de la cepa G148 de *Streptococcus*, se une a todas las subclases de IgG humanas y de ratón y como tal, tiene utilidad para el aislamiento de células recombinantes que expresan anticuerpos o proteínas de fusión de Fc de IgG. Para demostrar que el dominio de unión a Fc de IgG de la proteína G puede usarse como proteína de captura de la superficie celular capaz de unirse a todas las subclases de IgG humanas y de ratón, se construyó una línea CHO que expresa una proteína quimérica formada por el dominio de unión a Fc de la proteína G fusionado al dominio transmembrana e intracelular de hFcγRI. El dominio de unión a Fc de la proteína G contiene tres repeticiones homólogas de 55 aminoácidos de longitud (Guss et al., (1986) EMBO 5:1567 y Sjobring et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:399) y cada repetición es capaz de unirse a un Fc de IgG. Para mejorar la expresión de proteína quimérica en células CHO, se construyó un ADN sintético en el que se fusionó la secuencia de señal del gen ROR1 de ratón al dominio de unión a Fc, los aminoácidos 303 a 497 de la proteína G (n.º de referencia X06173) (SEQ ID NO: 1). Este ADN sintético se generó mediante una combinación de hibridación de oligonucleótidos, relleno de huecos y amplificación mediante la PCR. Después se fusionó el ADN sintético, mediante la PCR, a ADN que codifican los dominios transmembrana e intracelulares, aminoácidos 279 a 374 (SEQ ID NO: 2), de hFcγRI (n.º de registro M21091). El ADN resultante que codifica la proteína quimérica de proteína G/hFcγRI se clonó en pTE158 cadena abajo del promotor de CMV-MIE, reemplazando al gen que codifica hFcγRI, para dar el plásmido pTE300.

Una línea celular CHO K1 adaptada para crecer en medio asérico, RGC14, se transfectó con pTE300 y después de tres días se añadieron 400 µg/ml de G418 al medio de cultivo para seleccionar la integración estable de pTE300. Dos semanas después de comenzar la selección, las células se tiñeron con FITC-hFc para identificar células que expresaban hFcγRI. Estas células se analizaron mediante citometría de flujo y las células que expresaban hFcγRI se recogieron como un grupo. Las células se expandieron durante 10 días y se aisló nuevamente la población de células que expresan hFcγRI mediante citometría de flujo. Las células se expandieron nuevamente, se tiñeron con FITC-hFc y se aislaron las células individuales que expresaban altos niveles de la proteína quimérica de proteína G/hFcγRI mediante citometría de flujo. Las células individuales con tinción positiva para la unión de FITC-hFc se seleccionaron en medio compuesto por suero fetal bovino al 10 %, F12 de Ham al 90 % y 400 µg/ml de G418. Después de dos semanas de incubación, se examinaron 48 clones respecto de su unión a la IgG bovina presente en el medio de cultivo mediante tinción con fragmento F(ab')₂ anti-IgG bovina conjugado a FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Un clon, RGC18 que tuvo tinción positiva con este anticuerpo se seleccionó para su caracterización adicional.

45 Aislamiento de clones de expresión en RGC18: se transfectaron células RGC18 (6 x10⁶) con pTE209 y se seleccionaron para la integración del plásmido mediante cultivo en 400 µg/ml de higromicina durante 18 días. Las células resistentes a higromicina se incubaron con 1 mg/ml de IgG de conejo durante dieciocho horas antes de la tinción con fragmento F(ab')₂ policlonal anti-IgG humana (H+L) conjugado a FITC. Las células se tiñeron durante 1 hora y después se lavaron dos veces con PBS antes del análisis por citometría de flujo. Las células más fluorescentes (5 % superior) se aislaron mediante clasificación de células individuales y se expandieron durante 3 semanas. Se examinó la secreción de 4SC622 de diez clones. Todos los clones analizados secretaron 4SC622 a alto nivel y el mejor clon, RGC19, tenía una productividad específica de 6,4 pg/célula/día. Este resultado demostró que las células que expresaban 4SC622 se aislaron eficazmente de un grupo heterogéneo de células procedentes de la transfección estable de RGC18 con pTE209 mediante el método de trampa de secreción autóloga. Además, estos datos demostraron claramente que podía modificarse un fragmento de proteína G para que incluya una secuencia de señal y un dominio transmembrana y para que funcione como una proteína de captura de la superficie celular.

60 Para confirmar que 4SC622 se presentaba de manera autóloga en la superficie de las células RGC19 que expresaban tanto la proteína quimérica de proteína G/hFcγRI como 4SC622, se incubó RGC19 con 1 mg/ml de IgG de conejo durante 18 horas y después se tiñó con fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana (H+L) conjugado a FITC y se analizó mediante citometría de flujo. Se observó que las células RGC19 poseen 4SC622 en la superficie celular en estas condiciones en las que la alimentación cruzada se bloqueó mediante IgG de conejo, lo que sugiere la presentación autóloga de 4SC622. La IgG de conejo bloqueó eficazmente la unión de proteína 4SC622 exógena a las células RGC18, pero no bloqueó la presentación de 4SC622 en la superficie celular de células que expresan 4SC622. Estos datos demostraron que las propiedades de la proteína quimérica de proteína G/hFcγRI eran similares a los de hFcγRI

como proteína de captura de la superficie celular y sugirieron que el método de trampa de secreción autóloga puede emplear otras proteínas como proteínas de captura de la superficie celular.

Ejemplo 9: Aislamiento de células productoras de anticuerpo a partir de RGC10

Para demostrar la utilidad del método de trampa de secreción autóloga para el aislamiento de líneas celulares CHO que expresan anticuerpos recombinantes, se clonó el ADN que codifica los genes de cadena ligera variable y pesada variable a partir del hibridoma KD5. KD5 es un hibridoma que expresa un anticuerpo monoclonal específico para el receptor Tie-2 humano.

Se clonaron las secuencias génicas de la región constante de IgG de ratón a partir de 500ng de poliA+ARN de bazo de ratón (Clontech, Palo Alto, CA). El ADNc monocatenario se sintetizó usando el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript para RT-PCR, cebado con 50ng de hexámeros aleatorios (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). La secuencia de ADN constante ligera kappa (n.º de referencia Z37499) se amplificó a partir de este ADNc mediante la PCR usando los cebadores 5' mCLK1 (Z37499) (5'-CGGGCTGATG CTGCACCAAC TGTATCCATC TTC-3') (SEQ ID NO: 3) y 3' mCLK1 (Z37499) (5'-ACACTCTCCC CTGTTGAAGC TCTTGACAAT GGG-3') (SEQ ID NO: 4). La secuencia de región constante de IgG2a de ratón (n.º de referencia AJ294738) también se amplificó a partir de este ADNc mediante la PCR usando los cebadores 5' mCH2a (AJ294738) (5'-GCCAAAACAA CAGCCCCATC GGTCTATCCA C-3') (SEQ ID NO: 5) y 3' mCH2a (AJ294738) (5'-TCATTTACCC GGAGTCCGGG AGAAGCTCTT AGTCCG-3') (SEQ ID NO: 6). Los productos de la PCR se clonaron en pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) y se verificó la secuencia de las regiones constantes.

Los genes de la región variable de KD5 se amplificaron mediante RT-PCR a partir del ARNm del hibridoma KD5 y se clonaron en pCR2.1-TOPO usando las mezclas de cebadores de cadena pesada y ligera variable de Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). El gen de la cadena pesada variable se amplificó mediante la PCR usando la región variable clonada de pCR2.1-TOPO como molde con los cebadores 5' BspMI/KD5VH N-term (5'-GAGAGTACCT GCGTCATGCA GATGTGAAAC TGCAGGAGTC TGGCCCT-3') (SEQ ID NO: 7) y 3' BspMI/KD5VH C-term (5'-GAGAGACCTG CGTCAGCTGA GGAGACGGTG AC-CGTGGT-3') (SEQ ID NO: 8), se digirieron con BspMI y se ligaron al fragmento de PCR del gen de cadena pesada constante de IgG2a digerido con Bsal amplificado con los cebadores 5' Bsal/CH2a N-term (5'-GAGAGGGTCT CACAGCCAAA ACAACAGCCC CATCG-3') (SEQ ID NO: 9) y 3' Bsal/ CH2a C-term (5'-GAGAGGGTCT CCGGCCGCTC ATTTACCCGG AGTCCGGG AGAA-3') (SEQ ID NO: 10). Después, se ligó este fragmento en los sitios de BspMI y NotI de pRG882. El plásmido resultante, pTE317, tenía la capacidad de expresar el gen de cadena pesada recombinante de KD5, fusionado a la secuencia de señal de mROR1, a partir del promotor de CMV-MIE. El gen de la cadena ligera variable se amplificó mediante la PCR usando la región variable clonada de pCR2.1-TOPO como molde con los cebadores 5' BsmBI/KD5VL N-term (5'-GAGAGCGTCT CATGCAGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA-3') (SEQ ID NO: 11) y 3' BsmBI/KD5VL C-term (5'-GAGAGCGTCT CACAGCCCGT TTTATTTCCA GCTTGGTCCC-3') (SEQ ID NO: 12), digeridos con BsmBI y ligados al fragmento de la PCR del gen de cadena ligera constante kappa digerido con Bsal amplificado con los cebadores 5' Bsal/CLK N-term (5'-GAGAGGGTCT CAGCTGATGC TGCACCAACT GTATCC-3') (SEQ ID NO: 13) y 3' Bsal/CLK C-term (5'-GAGAGGGTCT CAGGCCGCTC AACACTCTCC CCTGTT-GAAG CTCTTGAC-3') (SEQ ID NO: 14). Después, se ligó este fragmento en los sitios de BspMI y NotI de pRG882. El plásmido resultante, pTE316, tenía la capacidad de expresar el gen de cadena ligera recombinante de KD5, fusionado a la secuencia de señal de mROR1, a partir del promotor de CMV-MIE.

El fragmento de EcoRI-NotI de 1450 pb de pTE317, que codifica el gen de cadena pesada de KD5, se clonó en los sitios de EcoRI y NotI de pRG980, un vector que confiere resistencia a la higromicina y permite la expresión de genes recombinantes para el promotor de UbC, para dar el plásmido pTE322. De manera similar, el fragmento de EcoRI-NotI de 750 pb de pTE316, que codifica el gen de cadena ligera de KD5, se clonó en los sitios de EcoRI y NotI de pRG985, un vector que confiere resistencia a la puromicina y permite la expresión de genes recombinantes para el promotor de UbC, para dar el plásmido pTE324. Se transfectaron células RGC10 (5×10^6) con 3 μ g de pTE322 y 3 μ g de pTE324 y se seleccionaron para la integración de los plásmidos mediante cultivo en medio F12 suplementado con suero fetal de ternero al 10 % con 20 μ g de puromicina y 400 μ g/ml de higromicina durante 14 días. La expresión de hFc γ RI se indujo mediante la adición de 1 μ g/ml de doxiciclina al medio de cultivo durante tres días. Las células doblemente resistentes se incubaron con 1 mg/ml de IgG de conejo durante dieciocho horas antes de la tinción con fragmento F(ab')₂ policlonal de cabra anti-IgG (Fc γ) de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Las células se tiñeron durante 1 hora y después se lavaron dos veces con PBS antes del análisis por citometría de flujo. Las células más fluorescentes (5 % superior) se aislaron como un grupo y se expandieron durante 10 días, tras lo cual se repitió el protocolo pero se aisló como un grupo el 1 % superior de las células más fluorescentes. Este grupo se expandió durante 10 días y después se aisló el 0,1 % superior de las células más fluorescentes como células individuales en placas de 96 pocillos. Los clones se analizaron mediante ELISA respecto de la expresión de anticuerpo y se seleccionaron siete clones de entre los 53 clones analizados. La productividad específica media de estos clones fue de 35 pg/célula/día y el mejor clon expresó el anticuerpo monoclonal KD5 recombinante a razón de 54 pg/célula/día.

Ejemplo 10: Las detecciones sistemáticas de FASTR™ no se ven afectadas por el nivel de expresión de CSCP

Para demostrar que el nivel de expresión de la CSCP no afecta significativamente a la capacidad para aislar células que expresan una sPOI asociada, se compararon detecciones sistemáticas de FASTR™ para la misma sPOI en dos líneas celulares hospedadoras diferentes que expresan cada una la misma CSCP pero o bien a un alto nivel o bien a un bajo nivel.

5 Se seleccionó la línea celular hospedadora de FASTR™ RGC10 para la expresión a alto nivel de la proteína hFcγRI mediante integración estable de pTE158 y se observó que contenía 40 copias del gen hFcγRI integradas. Una nueva línea celular, RS527, que expresaba la proteína hFcγRI a un menor nivel, se generó a partir de CHO K1 después de la transfección estable y la selección para la integración de una sola copia del gen. Las células RS527 expresaron significativamente menos proteína hFcγRI que las células RGC10, como se determinó mediante análisis de transferencia de Western de lisados de células completas en las líneas celulares de FASTR™.

10 Brevemente, se transfectaron células RGC10 y RS527 con pTE462, un plásmido capaz de expresar una proteína de fusión de hFc, Rc1-hFc, y de conferir resistencia a la higromicina. Los cultivos transfectados se seleccionaron con higromicina durante dos semanas. Las células resistentes a la higromicina se indujeron con 1 µg/ml de doxiciclina (Dox) y se bloquearon con IgG de conejo durante una noche, después del método FASTR™ descrito en el presente documento. Al día siguiente, se tiñeron los cultivos de RGC10/pTE462 y RS527/pTE462 mediante un anticuerpo conjugado a FITC específico para hFc y después se analizaron mediante citometría de flujo. Se seleccionaron tres grupos de células, R4, R5 y R6 con fluorescencia baja, media y alta, respectivamente, de cada línea celular hospedadora y se expandieron en cultivo tisular.

15 **Para** comparar el nivel de producción de proteína Rc1-hFc a partir de los seis grupos de células, se establecieron seis cultivos usando un número igual de células para cada grupo. Tres días más tarde, se recogieron los medios condicionados. Se determinaron los títulos de proteína Rc1-hFc en el medio condicionado mediante ELISA y se representaron frente a la fluorescencia media de los grupos de células respectivos. Para las líneas hospedadoras tanto RGC10 como RS527, hubo una correlación similar entre la fluorescencia media (cantidad de Rc1-hFc presentada en la superficie celular) y los niveles de producción de la proteína sPOI de los grupos de células aislados. De manera más significativa, los títulos de sPOI en los dos grupos de R6 de alta fluorescencia procedentes de RGC10 y RS527 fueron similares. Estos datos demuestran que el nivel de expresión de la CSCP en una línea celular hospedadora de FASTR™ no afecta significativamente al uso de ese hospedador para aislar células transfectadas basándose en el nivel de expresión de una sPOI.

Ejemplo 11: Receptor Tie2 como proteína de captura de la superficie celular

35 Pueden usarse proteínas de captura de la superficie celular (CSCP) distintas de FcγR1 en los métodos descritos en el presente documento. En este ejemplo, el receptor Tie2 funciona como CSCP y se usa para aislar células que expresan una proteína de fusión ScFv_{C1b}-Fc específica para Tie producida a partir del anticuerpo monoclonal C1b que se une específicamente al dominio extracelular del receptor Tie2. Aunque la CSCP para ScFv_{C1b}-Fc puede ser hFcγRI, este ejemplo demuestra que también puede usarse Tie2 como la CSCP para ScFv_{Cw}-Fc.

40 Para construir una línea celular inducible para CSCP de Tie2, en primer lugar se transfectaron de manera estable CHO K1 con el plásmido de TetR pcDNA6/TR. El grupo de células resistentes a blastidina se transfectaron de manera estable con pTE259, un plásmido que permite la expresión inducible de una proteína formado por el dominio extracelular y el dominio transmembrana de Tie2. Se aislaron clones celulares inducibles mediante citometría de flujo tras la tinción con un anticuerpo específico para Tie2. Se seleccionó el clon RGC54 para estudiar la viabilidad de FASTR™ para la expresión de ScFv_{C1b}-Fc.

45 Las células RGC54 se transfectaron de manera estable con pTE988, un plásmido capaz de expresar la proteína de fusión de hFc secretada ScFv_{C1b}-Fc y que confiere resistencia a la higromicina. El cultivo transfectado se seleccionó con higromicina durante dos semanas. Las células resistentes a la higromicina se indujeron con Dox y se bloquearon con 1 mg/ml de mAb C1b purificado. El anticuerpo monoclonal C1b fue la fuente de las regiones variables en ScFv_{C1b}-Fc. Al día siguiente, se tiñó el grupo de células mediante un anticuerpo conjugado a FITC específico para hFc y después se analizó mediante citometría de flujo. Se seleccionaron tres grupos de células, R6, R7 y R8 con fluorescencia alta, media y baja, respectivamente y se expandieron en cultivo tisular. Se establecieron tres cultivos usando un número igual de células para cada grupo para determinar la producción de proteína ScFv^{C1b}-Fc determinada mediante ELISA. Existía una correlación entre la fluorescencia media (cantidad de unión de ScFv_{C1b}-Fc a Tie2 en la superficie celular) y los niveles de producción de proteína ScFv_{C1b}-Fc de los grupos de células aislados.

50 Estos datos demuestran que las CSCP distintas de hFcγRI pueden servir como una CSCP y también sugieren que puede convertirse cualquier receptor en una CPSP mediante la eliminación de su dominio citoplasmático. Estos datos también demuestran que puede convertirse un antígeno en una CSCP y usarse para la detección sistemática mediante FASTR™ que expresan una molécula relacionada con un anticuerpo específico para un antígeno.

Ejemplo 12: Detecciones sistemáticas FASTR™ eficaces con pares de CSCP:sPOI que tienen baja afinidad

65 La angiopoyetina-1 es un ligando para el receptor Tie2. Una proteína quimérica que comprende el dominio de unión a

receptor de angiopoyetina-1 y hFc (FD1-hFc) se une a Tie2 con una constante de afinidad de 174 nM, determinada mediante BIAcore™. Se seleccionaron FD1-hFc y Tie2 como la sPOI y la CSCP, respectivamente, para determinar si es necesaria una afinidad mínima entre la CSCP y la sPOI para las detecciones sistemáticas de FASTR™.

5 En los experimentos de decoración de células, la FD1-hFc añadida de manera exógena se unió específicamente a células RGC54 a través de Tie2. Para determinar si la afinidad entre Tie2 y FD1-hFc es suficiente para posibilitar la detección sistemática de FASTR™, las células RGC54 se transfectaron de manera estable con pTE942, un plásmido capaz de expresar la proteína de fusión de hFc, FD1-hFc, y de conferir resistencia a la higromicina. El cultivo transfectado se seleccionó con higromicina durante dos semanas. Las células resistentes a higromicina se indujeron con Dox y se bloquearon con 1 mg/ml de FD1-mFc que comprende Fc de IgG1 de ratón. Al día siguiente, se tiñó el grupo de células mediante un anticuerpo conjugado a FITC específico para hFc y después se analizó mediante citometría de flujo. Se recogieron tres grupos de células, R6, R7 y R8 con fluorescencia alta, media y baja, respectivamente. Los cultivos se establecieron usando un número igual de células para cada grupo para determinar los niveles de producción de proteína FD1-hFc en el medio condicionado, determinados mediante ELISA. Hubo una correlación entre la fluorescencia media (unión de FD1-Fc a Tie2 unido a la superficie celular) y los niveles de producción de proteína FD1-hFc de los grupos de células aisladas. El grupo con la máxima fluorescencia produjo la mayor cantidad de FD1-hFc.

20 Estos datos demuestran que un par de CSCP:sPOI con baja afinidad (KD de 174 nM) puede usarse para detecciones sistemáticas de FASTR™ eficaces. De manera importante, la $t_{1/2}$ de disociación para la unión de FD1-Fc:Tie2 es menor de 2 minutos, lo que sugiere que cualquier par de CSCP:sPOI con una afinidad medible puede funcionar en las detecciones sistemáticas de FASTR™. Además, este experimento también demuestra que puede usarse un receptor distinto de FcγRI como la CSCP para aislar células que expresan su ligando.

25 **Ejemplo 12: La fusión de un dominio transmembrana a un scFv produce una CSCP funcional**

Una CSCP puede ser cualquier proteína unida a la superficie celular que tiene una afinidad medible por la sPOI. Para demostrar esto, se construyó una CSCP totalmente sintética fusionando en primer lugar el dominio transmembrana del receptor de PDGF a un scFv que contiene las regiones variables del anticuerpo monoclonal específico para la cadena kappa murina, HB58. Se construyó un hospedador de FASTR™ que expresa esta proteína quimérica (ScFv_{hb58}-TM_{pdgfr}) y se usó para aislar células que expresan el anticuerpo P12 específico para el dominio Fc de angiopoyetina-2.

35 La línea celular RS655, derivada de CHO K1, expresa ScFv_{hb58}-TM_{pdgfr} de manera constitutiva. Las células que expresan ScFv_{hb58}-TM_{pdgfr} pueden teñirse mediante incubación secuencial con el mAb P12, FD2-hFc y P12 anti-hIgG conjugado a FITC capturado en la superficie celular por el scFv HB58. ScFv se detectó por su afinidad por FD2, que a su vez se detectó mediante reconocimiento del marcador hFc. Las células RS656 se derivaron de células RS655 después de la transfección estable con un plásmido que codifica el gen para eYFP. Prácticamente un 100 % de las células RS656 fueron positivas para eYFP y la mayoría (76 %) mantuvo la expresión de ScFv_{hb58}-TM_{pdgfr}, detectada mediante la unión a FD2-hFc.

45 Las células RS655 se transfectaron de manera estable con pTE693, un plásmido capaz de expresar las cadenas pesada y ligera del anticuerpo P12 y de conferir resistencia a la puromicina. El cultivo transfectado se seleccionó con puromicina durante dos semanas para dar un grupo de células que eran heterogéneas con respecto a la expresión del mAb P12 (RS655/pTE693).

50 Para determinar si ScFv_{hb58}-TM_{pdgfr} podría funcionar como CSCP y facilitar el aislamiento de células productoras de anticuerpo de las no productoras, se mezclaron y cocultivaron números iguales de células RS656 y RS655/pTE693. Cuando se dejó que P12 expresado por células RS655/pTE693 se difundiese y se uniese a ScFv_{hb58} en la superficie de células RS656, una gran población de células de color amarillo también fueron positivas para la unión a FD2-hFc. Sin embargo, en caso de que el ScFv_{hb58} en la superficie de RS656 se uniese con un exceso de IgG murina, solo las células no de color amarillo fueron positivas para la unión a FD2-hFc, lo que demuestra que las células expresoras se separaron eficazmente de las células no expresoras.

55 Estos datos demuestran que puede producirse un scFv en una CSCP funcional dirigiéndolo a la membrana celular. Los datos también demuestran que FASTR™ permite que se detecten células que expresan un anticuerpo secretado con el antígeno para el anticuerpo.

60 **Ejemplo 13: Una proteína de interés que comprende una región variable de receptor de linfocitos T**

Se prepara un método de trampa de secreción autóloga basada en citometría de flujo (FASTR™) para aislar clones con alta expresión de una línea celular que expresa una proteína de interés que es un TCR-Fc, de un modo análogo a la preparación de una línea celular que expresa un anticuerpo de interés. Los clones con alta expresión se identifican sometiendo a detección sistemática células que presentan en su superficie el TCR-Fc de interés unido a hFcγR.

65 En estos ejemplos, se emplea la línea celular de CHO K1, RGC10, que comprende un FcγR1 inducible como molécula

de captura de la superficie celular. Se hace que RGC10 exprese los TCR-Fc recombinantes clonando regiones variables de TCR, en fase, con una región Fc humana, o bien directamente en fase o con una secuencia enlazadora entre las regiones variables de TCR y la región Fc humana.

5 Para producir una proteína de interés que es un dímero que comprende un dominio variable de TCR α ligado a Fc y un dominio variable β de TCR ligado a Fc, se transfecta RGC10 con dos vectores: un primer vector es capaz de expresar una proteína de fusión de dominio variable α de TCR con una secuencia de Fc humano y un segundo vector capaz de expresar una proteína de fusión de dominio β de TCR con la misma secuencia de Fc humano. Cada vector incluye la secuencia líder (por ejemplo, una secuencia de señal de secreción) en 5' con respecto a la región variable
10 del TCR y un marcador de selección que es un gen de resistencia a fármacos. Después de la transfección de cada vector, se seleccionan las células que contienen el vector mediante una selección farmacológica adecuada. La selección da como resultado una línea celular RGC10 que tiene tanto el primer como el segundo vector. Las células que expresan proteínas de interés pueden detectarse mediante uno o más de un anticuerpo para el dominio variable β , un anticuerpo para el dominio variable α y un anticuerpo para el dominio Fc.

15 Para producir una proteína de interés que es un dímero que comprende un tanto un dominio α como uno β de TCR fusionado a un Fc, se transfecta RGC10 con un solo vector que codifica una proteína de interés que se construye como se indica a continuación: una secuencia líder (por ejemplo, una secuencia de señal de secreción), seguida de un dominio variable β de TCR fusionado a un enlazador, donde el enlazador está, a su vez, fusionado a un dominio variable α de TCR, que a su vez está fusionado a una secuencia de Fc. Como alternativa, el vector individual puede construirse como se indica a continuación: una secuencia líder (por ejemplo, una secuencia de señal de secreción), seguida de un dominio variable α de TCR fusionado a un enlazador, donde el enlazador está, a su vez, fusionado a un dominio variable β de TCR, que a su vez está fusionado a una secuencia de Fc. Las células que expresan proteínas de interés pueden detectarse mediante uno o más de un anticuerpo para el dominio variable β , un anticuerpo para el dominio variable α y un anticuerpo para el dominio Fc.

20 Para producir las proteínas de interés, como se ha indicado anteriormente, que también comprenden un dominio constante de TCR α y/o TCR β , se fusiona el dominio variable de TCR (α o β) a un dominio constante de TCR (por ejemplo, se fusiona el dominio variable α de TCR al dominio constante α de TCR y el dominio variable β de TCR se fusiona al dominio constante β de TCR) y se fusiona el dominio variable + constante de TCR directamente o mediante un enlazador al dominio Fc. Las células que expresan proteínas de interés pueden detectarse mediante uno o más de un anticuerpo para el dominio variable β , un anticuerpo para el dominio variable α y un anticuerpo para el dominio Fc.

30 Las células que expresan cantidades deseadas del TCR-Fc se aíslan usando el mismo procedimiento al usado en el aislamiento de las líneas celulares productoras de 4SC622 descrito en el presente documento, usando uno o más de un anticuerpo para el dominio variable α , un anticuerpo para el dominio variable β , un anticuerpo para el dominio constante α y un anticuerpo para el dominio constante β y un anticuerpo para el dominio Fc. Las células que expresan los mayores niveles del TCR-Fc se seleccionan como líneas celulares productoras de TCR-Fc.

40 **Ejemplo 14: CSCP a base de scFv para el aislamiento de múltiples isotipos de IgG y anticuerpos biespecíficos**

Se inmunizó a ratones genéticamente modificados, cuyas regiones VDJ de cadena pesada de y VJ de cadena kappa de inmunoglobulina estaban reemplazadas por los ortólogos de humano (es decir, ratones Velocimmune®; véase la Patente de los Estados Unidos n.º 7.105.348), con o bien un fragmento Fc de una proteína IgG4 humana (hFc o simplemente Fc; SEQ ID NO: 26) o un polipéptido de Δ AdpFc humano que contiene la mutación de dipéptido (H95R, Y96F mediante IMGT; también conocido como Fc*; SEQ ID NO: 42). Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron de los ratones y se sometieron a detección sistemática de su capacidad para unirse a Fc, Fc* o a anticuerpos que comprenden Fc y/o Fc*. Se evaluaron tres anticuerpos que eran capaces de unirse a Fc (Ab1, Ab2, Ab3) y tres que eran capaces de unirse a Fc* (Ab4, Ab5, Ab6) respecto de su capacidad para unirse a moléculas que tienen uno de los siguientes formatos: Fc/Fc, Fc/Fc* (que puede ser un anticuerpo biespecífico) y Fc*/Fc*.

50 Las medidas para determinar las afinidades de unión y las constantes cinéticas se efectuaron en un instrumento Biacore 2000. Los anticuerpos (cada uno de Ab1-Ab8) se capturaron en una superficie sensora anti-Fc de ratón (formato de captura de mAb) y se inyectaron homodímeros de Fc (SEQ ID NO: 26), homodímeros de Fc* (SEQ ID NO: 42) o heterodímeros de Fc/Fc* sobre la superficie. Las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d) cinéticas se determinaron procesando y ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 usando el programa informático de ajuste de curvas Scrubber 2.0. Las constantes en equilibrio de disociación de unión (K_d) y las semividas de disociación ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinéticas como: K_d (M) = k_d / k_a ; y $t_{1/2}$ (min) = $(\ln 2) / (k_d)$. Como se muestra en la tabla 2, los anticuerpos fueron de 3 categorías distintas: específicos para Fc, específicos para Fc* y aquellos que no mostraban discriminación entre Fc y Fc* (no específicos). Los anticuerpos específicos para Fc eran dependientes de los aminoácidos His 95 y/o Tyr 96, ya que estos anticuerpos no se unen a Fc* humano con su mutación de dipéptido (H95R, Y96F). Por el contrario, los anticuerpos específicos para Fc* eran dependientes de Arg 95 y/o Phe 96, ya que estos anticuerpos no se unen a Fc humano de tipo silvestre.

65 **Ejemplo 15: Líneas celulares que producen Ab2 y proteína de fusión ScFv-Fc γ R derivada de Ab2**

Se secuenciaron la cadena pesada y la cadena ligera del Ab2 específico para Fc. Para producir el anticuerpo Ab2 recombinante, se construyó un plásmido de vector de expresión que codifica la cadena pesada y se construyó un plásmido de vector de expresión que codifica la cadena ligera. Ambos vectores permiten la expresión y la secreción de las respectivas subunidades en una célula CHO. Para expresar el anticuerpo, se transfectaron ambos plásmidos en una célula CHO-K1 y se aislaron los transformantes estables. La expresión de las cadenas de anticuerpo estaba impulsada por el promotor de CMV constitutivo.

Tabla 2: Afinidad de los anticuerpos - Estudios de resonancia de plasmón superficial

Anticuerpo	Diana de POI	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)	t 1/2 (min)	Especificidad
Ab1	Fc/Fc	1,07E+05	3,79E-04	3,54E-09	30	Fc
	Fc/Fc*	8,16E+04	3,01 E-04	3,69E-09	38	
	Fc*/Fc*	NB	NB	NB	NB	
Ab2	Fc/Fc	7,86E+04	3,50E-05	4,45E-10	330	Fc
	Fc/Fc*	5,45E+04	1,00E-06	1,84E-11	11550	
	Fc*/Fc*	NB	NB	NB	NB	
Ab3	Fc/Fc	1,77E+05	4,08E-02	2,30E-07	0,3	Fc
	Fc/Fc*	4,51 E+04	2,60E-02	5,77E-07	0,4	
	Fc*/Fc*	NB	NB	NB	NB	
Ab4	Fc/Fc	NB	NB	NB	NB	Fc*
	Fc/Fc*	6,00E+03	1,00E-06	2,00E-10	11550	
	Fc*/Fc*	2,22E+04	9,56E-06	4,50E-10	1209	
Ab5	Fc/Fc	NB	NB	NB	NB	Fc*
	Fc/Fc*	3,11 E+05	1,00E-06	3,21E-12	11550	
	Fc*/Fc*	5,57E+05	1,00E-06	1,79E-12	11550	
Ab6	Fc/Fc	NB	NB	NB	NB	Fc*
	Fc/Fc*	4,48E+05	7,43E-04	1,66E-09	16	
	Fc*/Fc*	8,73E+05	5,93E-04	6,79E-10	19	
Ab7	Fc/Fc	6,02E+05	2,42E-04	4,02E-10	48	No específica
	Fc/Fc*	4,90E+05	2,15E-04	4,39E-10	54	
	Fc*/Fc*	4,46E+05	3,20E-02	7,18E-08	0,4	
Ab8	Fc/Fc	2,59E+05	4,88E-04	1,88E-09	24	No específica
	Fc/Fc*	1,88E+05	4,02E-04	2,14E-09	29	
	Fc*/Fc*	4,10E+04	3,90E-02	9,60E-07	0,3	

- 10 Se usaron las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera para desarrollar una molécula de captura de la superficie de scFv anti-Fc. Para producir el ácido nucleico que codifica la molécula de captura de la superficie anti-Fc derivada de Ab2, ScFv-FcγR, se retrotradujeron las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de la inmunoglobulina Ab2 (SEQ ID NO: 15) y del dominio variable de cadena ligera de la inmunoglobulina Ab2 (SEQ ID NO: 16) y se optimizaron los codones para la expresión en células CHO. De manera análoga, se optimizaron los codones de la porción C-terminal de FcγRI humano para la expresión en células CHO. Las secuencias de nucleótidos con codones optimizados se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa y se ligaron para formar una secuencia de ácido nucleico contigua (SEQ ID NO: 20) que codifica la proteína de fusión ScFv-FcγR de SEQ ID NO: 19.
- 15
- 20 Se insertó el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión ScFv-FcγR-TM-cito en un vector de expresión usando técnicas convencionales de PCR y de clonación con endonucleasa de restricción. El plásmido circular resultante, ilustrado en la SEQ ID NO: 23, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica beta-lactamasa y dos operones. El primer operón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica proteína fluorescente amarilla (YFP), una variante de la proteína fluorescente verde, en fase con un marcador de resistencia a neomicina, impulsado por un promotor de SV40 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 24). El segundo operón, que es el "extremo funcional" del vector a efectos de este aspecto de la invención, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión ScFv-FcγR con codones optimizados, impulsada por un promotor de hCMV-IE y el intrón de hCMV (por ejemplo, la SEQ ID NO: 25).
- 25
- 30 Las células CHO-K1 se transfectaron con el plásmido de SEQ ID NO: 23. Los integrantes estables, que tienen integrada la construcción lineal de la SEQ ID NO: 22 en sus genomas, se aislaron.

El plásmido circular contiene dos sitios de *Lox* que flanquean el primer operón y el segundo operón, para permitir la integración de estos operones como una construcción lineal en el genoma de la célula hospedadora. La construcción lineal que abarca desde el primer sitio de *Lox* hasta el segundo sitio de *Lox* se ejemplifica en la SEQ ID NO: 22 y comprende de 5' a 3': promotor de SV40, ácido nucleico que codifica resistencia a la neomicina, IRES, ácido nucleico que codifica eYFP, secuencia de poliadenilación de SV40, promotor de hCMV-IE, intrón de hCMV,

secuencia de operador Tet (para la expresión controlada de la proteína de fusión ScFv-FcγR-TM-cito), ácido nucleico que codifica la secuencia de señal de mROR, ácido nucleico que codifica el scFv Ab2, ácido nucleico que codifica la porción transmembrana y citoplasmática de FcγR (SEQ ID NO: 21) y secuencia de poliadenilación de SV40.

5 Ejemplo 16: Dianas de captura de la superficie de ScFv-FcγR-TM-cito

Se transfectaron células CHO-K1 que contienen la secuencia integrada de SEQ ID NO: 22 con plásmidos que codifican anticuerpos de diversos subtipos, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG4, un anticuerpo biespecífico IgG4 que contiene un dominio CH3 con la sustitución dual 95R/435R-96F/436F mientras que el otro dominio CH3 es de tipo silvestre (IgG4 Fc/Fc*) y un anticuerpo biespecífico IgG1 con el formato Fc de IgG1/Fc*. Las células se trataron con doxiciclina para inducir la producción de la molécula de captura junto con el anticuerpo. Después de la coexpresión del anticuerpo y la molécula de captura, se trataron las células en algunos casos con proteína de bloqueo de hFc y molécula de detección (anti-hFab marcado con FITC). La tabla 3 resume los resultados y muestra generalmente que la proteína de fusión de captura de la superficie ScFv-FcγR se une a moléculas de IgG4, IgG2 e IgG1, mientras que la molécula de captura de la superficie FcγR de tipo silvestre se une a IgG1, pero no a IgG4 o IgG2.

Tabla 3: Ensayos de competición de molécula de bloqueo

Anticuerpo	Unidades de FITC arbitrarias (con o sin molécula de bloqueo de hFc) - Modo					¿Desplazamiento de hFc?
	Sin hFc	hFc (1 h)	hFc (2 h)	hFc (20 h)	Sin recubrimiento	
	Molécula de captura = ScFv-FcγR-TM-cito Molécula de detección = FITC-anti-hFab					
mAb-3 de IgG1	250	120	80	20	10	Sí
mAb-4 de IgG4	250	100	55	20	10	Sí
mAb-5 de IgG4	250	70	40	20	10	Sí
mAb-6 de IgG2	200 ¹	ND	ND	ND	122	Sí
mAb-3 de IgG1	300	80	30	9	3,5	Sí
mAb-4 de IgG4	100	2	2	2	2	No
mAb-5 de IgG4	35	5	5	5	5	No

¹ + Dox ² -Dox

20 Ejemplo 17: Líneas celulares que producen Ab6 y ScFv*-FcγR-TM-cito derivado de Ab6

Se secuenciaron la cadena pesada y la cadena ligera del Ab6 específico para Fc*. Se determinó que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera era la SEQ ID NO: 41. Se determinó que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada era la SEQ ID NO: 40. Para producir el anticuerpo Ab6 recombinante, se construyó un plásmido de vector de expresión que codifica la cadena pesada y se construyó un plásmido de vector de expresión que codifica la cadena ligera. Para expresar el anticuerpo, se transfectaron ambos plásmidos en una célula CHO-K1, se aislaron los transformantes estables y la expresión se impulsó por el promotor de CMV constitutivo.

Para producir el ácido nucleico que codifica la molécula de captura de la superficie específica anti-Fc* derivada de Ab6, ScFv*-FcγR, se retrotradujeron las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo Ab6 (SEQ ID NO: 38) y del dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina de Ab6 (SEQ ID NO: 39) y se optimizaron los codones para la expresión en células CHO. De manera análoga, se optimizaron los codones de la porción C-terminal de FcγRI humano (SEQ ID NO: 21) para su expresión en células CHO. Las secuencias de nucleótidos con codones optimizados se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa y se ligaron para formar una secuencia de ácido nucleico contigua (SEQ ID NO: 45) que codifica la proteína de fusión anti-Fc*, ScFv*-FcγR (SEQ ID NO: 43).

Se insertó el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión ScFv*-FcγR-TM-cito en un vector de expresión usando técnicas convencionales de PCR y de clonación con endonucleasa de restricción. El plásmido circular resultante, ilustrado en la SEQ ID NO: 44, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica beta-lactamasa y dos operones. El primer operón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica proteína fluorescente amarilla (YFP), una variante de la proteína fluorescente verde, en fase con un marcador de resistencia a neomicina, impulsado por un promotor de SV40 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 46). El segundo operón, que es el "extremo funcional" del vector a efectos de este aspecto de la invención, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión anti-Fc* ScFv-FcγR con codones optimizados, impulsada por un promotor de hCMV-IE y el intrón de hCMV (por

ejemplo, la SEQ ID NO: 47).

Las células CHO-K1 se transfectaron con el plásmido de SEQ ID NO: 44. Los integrantes estables, que tienen integrada la construcción lineal de la SEQ ID NO: 48, se aislaron.

El plásmido circular contiene dos sitios de *Lox* que flanquean el primer operón y el segundo operón, para permitir la integración de estos operones como una construcción lineal en el genoma de la célula hospedadora. La construcción lineal que abarca desde el primer sitio de *Lox* hasta el segundo sitio de *Lox* se ejemplifica en la SEQ ID NO: 48 y comprende de 5' a 3': promotor de SV40, ácido nucleico que codifica resistencia a la neomicina, IRES, ácido nucleico que codifica eYFP, secuencia de poliadenilación de SV40, promotor de hCMV-IE, intrón de hCMV, secuencia de operador Tet (para la expresión controlada de la proteína de fusión anti-Fc* ScFv*-FcγR), ácido nucleico que codifica la secuencia de señal de mROR, ácido nucleico que codifica el ScFv* específico anti-Fc* derivado de Ab6, ácido nucleico que codifica el polipéptido del dominio transmembrana y citoplasmático de FcγR (SEQ ID NO: 21) y secuencia de poliadenilación de SV40.

Ejemplo 18: Clasificación de anticuerpos biespecíficos

Captura de anti-Fc y detección de anti-Fc*

Se evaluó la capacidad del sistema de captura de la superficie específico anti-Fc, ScFv-FcγR derivado de Ab2 para detectar y enriquecer células que producen anticuerpos biespecíficos. Para evaluar la capacidad para detectar anticuerpos biespecíficos, que portan la sustitución 95R/435R-96F/436F en uno de los dominios CH3 (denominados Fc*), se expresaron varios anticuerpos en la línea celular de captura de la superficie de específico anti-Fc ScFv-FcγR derivado de Ab2, usando hFc como molécula de bloqueo y un anticuerpo anti-Fc* Ab6 marcado con FITC (por ejemplo, mAb con la HC de SEQ ID NO: 40 y la LC de SEQ ID NO: 41) como molécula de detección. La línea celular de captura de la superficie específica anti-Fc ScFv-FcγR derivada de Ab2 fue capaz de detectar y distinguir el anticuerpo biespecífico (Fc/Fc*) frente a cualquiera de los anticuerpos monoespecíficos Fc*/Fc* o Fc/Fc usando el Ab6 específico para Fc* como molécula de detección (tabla 4). La línea celular de captura de la superficie FcγR de tipo silvestre no era capaz de distinguir entre las especies de IgG4 de Fc/Fc*, Fc*/Fc* y Fc/Fc, ya que FcγR es incapaz de unirse o se une con muy baja afinidad a IgG4.

Captura de anti-Fc* y detección de anti-Fc

Por el contrario, se evaluó la capacidad del sistema de captura de la superficie específico anti-Fc*, ScFv*-FcγR derivado de Ab6 para detectar y enriquecer células que producen anticuerpos biespecíficos. Para evaluar la capacidad para detectar anticuerpos biespecíficos, que portan la sustitución 95R/435R-96F/436F en uno de los dominios CH3 (denominados Fc*), se expresaron varios anticuerpos en la línea celular de captura de la superficie de específico anti-Fc* ScFv*-FcγR derivado de Ab6, usando hFc como molécula de bloqueo y anticuerpo anti-Fc Ab2 marcado con Alexa 488, que reconoce a CH3 no sustituido, como la molécula de detección. La línea celular de captura de la superficie específica anti-Fc* ScFv*-FcγR derivada de Ab6 fue capaz de detectar y distinguir el anticuerpo biespecífico (Fc/Fc*) frente a los anticuerpos monoespecíficos Fc*/Fc* o Fc/Fc usando el Ab2 específico para Fc como molécula de detección (tabla 4). La línea celular de captura de la superficie FcγR no era capaz de distinguir entre las especies de IgG4 de Fc/Fc*, Fc*/Fc* y Fc/Fc.

Tabla 4: Detección de anticuerpo biespecífico - Intensidad media de fluorescencia (IMF)

1 CSCP	2 DM	IgG1			IgG4			Especificidad de Fc/Fc*
		Fc/Fc*	Fc*/Fc*	Fc/Fc	Fc/Fc*	Fc*/Fc*	Fc/Fc	
FcγR	Ab2	500	ND	350	200	200	200	NO
	Ab6	200	200	200	ND	ND	ND	NO
	Anti-hFc	1800	ND	1000	ND	ND	ND	NO
ScFv-FcγR	Ab6	500	15	15	500	15	15	SÍ
	Anti-hFc	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ScFv*-FcγR	Ab2	150	10	10	ND	ND	ND	SÍ
	Anti-hFc	200	ND	10	ND	ND	ND	SÍ

¹Proteína de captura de la superficie celular ²Molécula de detección

Ejemplo 19: Enriquecimiento de anticuerpos biespecíficos Fc/Fc*

Para evaluar la capacidad de los sistemas de CSCP ScFv-FcγR (derivada de Ab2)/DM de anti-Fc* (Ab6) y CSCP ScFv*-FcγR (derivada de Ab6)/DM anti-Fc (Ab2) para seleccionar y enriquecer anticuerpos biespecíficos, las líneas celulares que coexpresaban un anticuerpo monoclonal IgG4 Fc/Fc* (IgG4-mAb-2) y la proteína de fusión anti-Fc ScFv-FcγR, usando hFc como la molécula de bloqueo y el anticuerpo anti-Fc* marcado con FITC (Ab6) como molécula de detección, se sometieron a clasificación de células activada por fluorescencia y agrupamiento en serie para enriquecer respecto de la producción de las especies de Fc/Fc*. Las células que producían Fc/Fc* de los grupos de las series

- quinta y sexta se analizaron respecto del título total de anticuerpo y los títulos de cada formato de anticuerpo: Fc/Fc*, Fc/Fc y Fc*/Fc*. Dado que las células codifican tanto una cadena pesada que codifica el dominio CH3 no sustituido ("Fc", es decir, comprende una histidina en la posición 95 de IMGT y una tirosina en la posición 96 de IMGT) y una cadena pesada que codifica el dominio CH3 sustituido ("Fc*", es decir, comprende una arginina en la posición 95 de IMGT y una fenilalanina en la posición 96 de IMGT), mediante un análisis de cuadrados de Punnett estrictamente matemático, se espera que la célula produzca en teoría un 25 % de Fc/Fc, un 50 % de Fc/Fc* y un 25 % de Fc*/Fc*. Biológicamente, sin embargo, se podría esperar (antes del enriquecimiento) que la mayoría del anticuerpo producido sea Fc/Fc.
- 10 Como se muestra en la tabla 5, las células seleccionadas, agrupadas y enriquecidas respecto de la producción de anticuerpo biespecífico produjeron hasta un 49 % de especies de Fc/Fc*, con títulos de anticuerpos biespecíficos Fc/Fc* de al menos 3,2 g/l.

Tabla 5: Enriquecimiento de anticuerpo biespecífico Fc/Fc* IgG4-mAb-2

grupo	Línea celular	Fc/Fc*		Fc/Fc		Fc*/Fc*	
		Título (g/l)	%	Título (g/l)	%	Título (g/l)	%
5	1	1,2	28	2,2	50	0,99	23
	2	1,9	49	1,3	32	0,73	19
	3	1,5	47	1,2	40	0,40	13
	4	1,6	37	1,3	31	1,3	32
	5	1,5	48	1,1	35	0,58	18
	6	1,8	47	1,3	33	0,75	20
6	7	2,6	44	2,0	34	1,3	23
	8	3,2	42	2,4	31	2,0	27
	9	2,1	45	1,5	33	1,0	22
	10	2,8	43	2,0	31	1,7	28
	11	2,3	44	1,6	31	1,3	24

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- 20 <120> PROTEÍNAS DE CAPTURA DE LA SUPERFICIE CELULAR RECOMBINANTES
- <130> 8600-WO
- <150> US 61/726.040
- 25 <151> 14/11/2012
- <160> 51
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
- <211> 195
- <212> PRT
- <213> *Streptococcus*
- 35 <400> 1

ES 2 805 526 T3

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

<210> 2
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 805 526 T3

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

5 <210> 3
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 3
 cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc ttc 33

15 <210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintético

<400> 4
 aactctccc ctgtgaagc tcttgacaat ggg 33

25 <210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintético

<400> 5
 gccaaaacaa cagccccatc ggtctatcca c 31

35 <210> 6
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> sintético

<400> 6
 tcattaccg ggagtcggg agaagctctt agtcg 35

<210> 7
 <211> 47
 <212> DNA
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 10 <400> 7
 gagagtacct gcgtcatgca gatgtgaaac tgcaggagtc tggccct 47

 <210> 8
 <211> 38
 15 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 20
 <400> 8
 gagagacctg cgtcagctga ggagacgggtg accgtggt 38

 <210> 9
 <211> 35
 25 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 30
 <400> 9
 gagagggctc cacagccaaa acaacagccc catcg 35

 <210> 10
 <211> 42
 35 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético
 40
 <400> 10
 gagagggctc cggccgctc atttaccgg agtccgggag aa 42

 <210> 11
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sintético

 <400> 11
 55 gagagcgtct catgcagaca tccagatgac ccagtccca 40

 <210> 12
 <211> 40
 <212> DNA
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 <400> 12
 65 gagagcgtct cacagcccgt tttattcca gcttggctcc 40

ES 2 805 526 T3

<210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 10 <400> 13
 gagagggtct cagctgatgc tgcaccaact gtatcc 36

 <210> 14
 <211> 48
 15 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 20 <400> 14
 gagagggtct caggccgctc aacctctcc cctgttgaag ctcttgac 48

 <210> 15
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 30 <400> 15

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

 Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile
 20 25 30

 His Trp Glu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
 35 40 45

 Ile Asn Pro Asn Thr Gly His Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
 50 55 60

 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 65 70 75 80

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

 Thr Tyr Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

 Leu

 <210> 16
 <211> 112
 35 <212> PRT

ES 2 805 526 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

5

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val
 1 5 10 15
 Leu Trp Val Thr Ile
 20

<210> 18

<211> 61

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

10

15

20

ES 2 805 526 T3

Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu
 1 5 10 15

Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg
 20 25 30

His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu
 35 40 45

Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr
 50 55 60

<210> 19

<211> 334

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> sintético

<400> 19

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

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

ES 2 805 526 T3

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

ES 2 805 526 T3

Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser Leu Gln Glu Asp
 290 295 300

Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln
 305 310 315 320

Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr
 325 330

5 <210> 20
 <211> 1005
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 20

caagtacaac tgcaacaaag cggagctgaa ctggccaaac caggcgcttc cgtgaagatg 60
 tcttgtaaag ccagcgggta tacatttact aattactgga ttcactggga gaagcaaaga 120
 cctgaacagg gattggaatg gattggatac attaatccta acaccggaca cacagagtat 180
 aatcaaaaat tcaaggataa ggccaccctc acagccgaca gatcttcttc aaccgcctat 240
 atgcaacttt cttccctcac ttctgaagac tccgcagttt acttttgcg acgaacttat 300
 tctggaagct cccatttcca ctactggggg caaggaacaa cactgatcgt gtctagcggc 360
 ggcggagggt ccggcggggg cggtagcggg ggcggagggt ctgatattgt catgactcaa 420
 acacctgtct ctctgcctgt ttcacttggg gatcaagcta gcatttctctg ccgctctagt 480
 caatctctcg tccacaacaa cggcgatact ttcttgcatt ggtatctgca gaaaccaggt 540
 cagtcaccta aactgcttat atacaaagtc tctaatagat tctcaggggt gccagatcga 600
 ttcagtggtt ctgggtccgg tacagatfff aactcaaga tatccagagt agaagcagaa 660
 gatctgggcg tgtatttctg cagtcaaaca aacttattc ctctgacttt tggaggcggg 720
 aaaaactgg agatcaagcg tggaggcggg gggagtgttt tgttttatct ggccgttggg 780
 ataatgtttc tcgtaaatac agtactttgg gtaacaataa ggaaggaact gaagagaaag 840
 aaaaaatggg atctggaaat atcattggac agtggacacg aaaaaaagt cacatcatca 900
 ttgcaagaag accggcactt ggaggaggaa ctgaaatgtc aagagcaaaa agaagaacaa 960
 ctgcaagaag gcgtacatag aaaagaacca cagggagcaa catag 1005

15 <210> 21
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 21

ES 2 805 526 T3

Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val
 1 5 10 15

Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp
 20 25 30

Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser
 35 40 45

Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln
 50 55 60

Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly
 65 70 75 80

Ala Thr

<210> 22
 <211> 5759
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 22

5
 10

```

acaacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatggtacc aagcctaggc ctccaaaaaa 60
gcctcctcac tacttctgga atagctcaga ggcagaggcg gcctcggcct ctgcataaat 120
aaaaaaaaatt agtcagccat ggggcggaga atgggcggaa ctgggcggag ttagggcgcg 180
gatgggcgga gttagggcg ggactatggt tgctgactaa ttgagatgca tgctttgcat 240
acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacacctg gttgctgact aattgagatg 300
catgctttgc atacttctgc ctgctgggga gcctggggac tttccacacc ggatccacca 360
tgggttcagc tattgagcag gatgggttgc atgctggtag tcccgccgca tgggtcgaac 420
gactgtttgg atacgattgg gcccaacaga ctataggctg ttccgacgct gctgtctttc 480
gtctttctgc acaaggtcgt ccagttctgt tcgtgaaaac cgacttgtcc ggagccctca 540
atgagttgca agacgaagct gcacgactga gttggcttgc caccactggt gtcccattgtg 600
ccgcagtact tgacgtcgtc acagaggctg gtcgcgattg gttgctcctt ggagaagtgc 660
ccggccaaga tcttctcagt tcccaccttg cccctgccga aaaagtttca ataatggctg 720
acgctatgag aaggctgcac acccttgacc ctgccacatg tccattcgat caccaagcca 780
aacaccgaat tgaacgagct agaaccgcga tggaagccgg cctcgttgat caagacgatt 840
  
```

ES 2 805 526 T3

tggatgagga acaccagggc ctgcacccg ctgaactctt cgctcgctc aaagcacgaa 900
 tgccagacgg agatgacttg gtcgtaaccc acggagatgc ctgccttctt aacataatgg 960
 tagagaatgg aagathtagc ggcttcattg attgtggacg acttgaggtt gcagatcggc 1020
 accaagatat cgctctcgct accagagata ttgctgaaga attgggcgga gaatgggctg 1080
 atcggtttct cgtactctac ggaattgccc cacctgattc ccaacgcatt gctttttacc 1140
 gtcttctgga tgagtcttc taaacgcgtc cccctctcc ctccccccc cetaacgta 1200
 ctggccgaag ccgcttgaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgta ttttccacca 1260
 tattgccgtc ttttggaat gtgagggccc gaaacctg ccctgtctt ttgacgagca 1320
 ttctagggg tcttccccct ctgcgcaaag gaatgcaag tctgttgaat gtcgtgaagg 1380
 aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcagc 1440
 agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata 1500
 cacctgcaaa ggcggcacaa cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag 1560
 tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc 1620
 attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgt tagtcgaggt 1680
 taaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgatt 1740
 gctcgaatca ccatggtgag caagggcgag gagctgttca cgggggtggt gcccatcctg 1800
 gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc 1860
 gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcatctgca ccaccgcaa gctgccctg 1920
 ccctggccca ccctcgtgac caccttcggc tacggcctgc agtgcttgc ccgctacccc 1980
 gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccagag 2040
 cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacct gcgcccagggt gaagttcgag 2100
 ggcgacacc tggtgaaccg catcgagctg aaggcatcg acttcaagga ggacggcaac 2160
 atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac 2220
 aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgc acaacatcga ggacggcagc 2280
 gtcgagctcg ccgaccacta ccagcagaac accccatcg gcgacggccc cgtgctgctg 2340
 cccgacaacc actacctgag ctaccagtc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc 2400
 gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcactctcgg catggacgag 2460
 ctgtacaagt aatcggccgc taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt 2520
 aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttggtgt 2580
 taacttgttt attgcagctt ataatggta caaataaagc aatagcatca caaattcac 2640
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 2700
 ttatcatgtc ggccggttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 2760

ES 2 805 526 T3

ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tcogcgttac ataacttacg gtaaattggcc 2820
 cgcctggctg accgcccac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 2880
 tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 2940
 cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 3000
 acggtaaattg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 3060
 ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca 3120
 tcaatggggc tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg 3180
 tcaatggggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 3240
 ccgccccatt gacgcaaattg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggctctat ataagcagag 3300
 ctctccctat cagtgataga gatctcccta tcagtgatag agatcgtcga cgttttagtga 3360
 accgtcagat cgcctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccggg 3420
 accgatccag cctccgcggc cgggaacggt gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga 3480
 gtgacgtaag taccgcctat agagtctata ggcccacccc cttggcttct tatgcatgct 3540
 atactgtttt tggcttgggg tctatacacc ccogcttctt catgttatag gtgatggtat 3600
 agcttagcct ataggtgtgg gttattgacc attattgacc actcccctat tggtgacgat 3660
 actttccatt actaatccat aacatggctc tttgccacaa ctctctttat tggctatatg 3720
 ccaatacact gtccttcaga gactgacacg gactctgtat ttttacagga tggggctca 3780
 tttattattt acaaattcac atatacaaca ccaccgtccc cagtgcccgc agtttttatt 3840
 aaacataacg tgggatctcc acgcgaatct cgggtacgtg ttccggacat ggtctcttct 3900
 ccggtagcgg cggagcttct acatccgagc cctgctccca tgcctccagc gactcatggt 3960
 cgctcggcag ctcccttgctc ctaacagtgg aggccagact taggcacagc acgatgccca 4020
 ccaccaccag tgtgccgcac aaggccgtgg cggtagggta tgtgtctgaa aatgagctcg 4080
 gggagcgggc ttgcaccgct gacgcatttg gaagacttaa ggcagcggca gaagaagatg 4140
 caggcagctg agttgttgtg ttctgataag agtcagaggt aactcccgtt gcgggtctgt 4200
 taacggtgga gggcagtgta gtctgagcag tactcgttgc tgccgcgcgc gccaccagac 4260
 ataatagctg acagactaac agactgttcc tttccatggg tcttttctgc agtcaccgtc 4320
 cttgacacga agcttatact cgagctctag attgggaacc cgggtctctc gaattcgaga 4380
 tctccaccat gcacagacct agacgtcgtg gaactcgtcc acctccactg gcaactgctcg 4440
 ctgctctcct cctggctgca cgtggtgctg atgcacaagt acaactgcaa caaagcggag 4500
 ctgaactggc caaaccaggc gcttccgtga agatgtcttg taaagccagc gggatatacat 4560
 ttactaatta ctggattcac tgggagaagc aaagacctga acagggattg gaatggattg 4620

ES 2 805 526 T3

gatacattaa tcctaacacc ggacacacag agtataatca aaaattcaag gataaggcca 4680
 ccctcacagc cgacagatct tcttcaaccg cctatatgca actttcttcc ctcaacttctg 4740
 aagactccgc agtttacttt tgcgcacgaa cttattctgg aagctcccat ttcgactact 4800
 ggggtcaagg aacaacactg atcgtgtcta gcggcggcgg aggggtccggc gggggcggta 4860
 gcggtggcgg aggttctgat attgtcatga ctcaaacacc tgtctctctg cctgtttcac 4920
 ttggagatca agctagcatt tcctgccgct ctagtcaatc tctcgtccac aacaacggcg 4980
 atactttctt gcattggtat ctgcagaaac caggctcagtc acctaaactg cttatataca 5040
 aagtctctaa tagattctca ggggtgccag atcgattcag tggttctggg tccggtacag 5100
 attttacact caagatatcc agagtagaag cagaagatct gggcgtgtat ttctgcagtc 5160
 aaacaacact tattcctcgt acttttgagg gcggtacaaa actggagatc aagcgtggag 5220
 gcggagggag tgttttggtt tatctggccg ttgggataat gtttctcgta aatacagtac 5280
 tttgggtaac aataaggaag gaactgaaga gaaagaaaa atgggatctg gaaatatcat 5340
 tggacagtgg acacgaaaaa aaagtcacat catcattgca agaagaccgg cacttggagg 5400
 aggaactgaa atgtcaagag caaaaagaag aacaactgca agaaggcgta catagaaaag 5460
 aaccacaggg agcaacatag gcggccgcta atcagccata ccacatttgt agaggtttta 5520
 cttgctttta aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt 5580
 gttgttgta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca 5640
 aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc 5700
 aatgtatctt atcatgtcta ccggtataac ttcgtataat gtatactata cgaagttag 5759

<210> 23
 <211> 7627
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 23

aagcttatac tcgagctcta gattgggaac ccgggtctct cgaattcgag atctccacca 60
 tgcacagacc tagacgtcgt ggaactcgtc cacctccact ggcactgctc gctgctctcc 120
 tctggctgc acgtggtgct gatgcacaag tacaactgca acaaagcgga gctgaactgg 180
 ccaaaccagg cgcttccgtg aagatgtctt gtaaagccag cgggtataca tttactaatt 240
 actggattca ctgggagaag caaagacctg aacagggatt ggaatggatt ggatacatta 300
 atcctaacac cggacacaca gagtataatc aaaaattcaa ggataaggcc accctcacag 360
 ccgacagatc ttcttcaacc gcctatatgc aactttcttc cctcacttct gaagactccg 420
 cagtttactt ttgcgcacga acttattctg gaagctccca tttcgactac tggggtaagg 480

ES 2 805 526 T3

gaacaacact gatcgtgtct agcggcggcg gaggggtccgg cgggggagggt agcgggtggcg 540
 gaggttctga tattgtcatg actcaaacac ctgtctctct gcctgtttca cttggagatc 600
 aagctagcat ttcctgccgc tctagtcaat ctctcgtcca caacaacggc gatactttct 660
 tgcattggta tctgcagaaa ccaggtcagt cacctaaact gcttatatac aaagtctcta 720
 atagattctc aggggtgcca gatcgattca gtggttctgg gtccgggtaca gattttacac 780
 tcaagatatac cagagtagaa gcagaagatc tgggcgtgta tttctgcagt caaacaacac 840
 ttattcctcg tacttttggga ggcgggtacaa aactggagat caagcgtgga ggcggaggga 900
 gtgttttgtt ttatctggcc gttgggataa tgtttctcgt aaatacagta ctttgggtaa 960
 caataaggaa ggaactgaag agaaagaaaa aatgggatct ggaaatatca ttggacagtg 1020
 gacacgaaaa aaaagtcaca tcatcattgc aagaagaccg gcacttggag gaggaactga 1080
 aatgtcaaga gcaaaaagaa gaacaactgc aagaaggcgt acatagaaaa gaaccacagg 1140
 gagcaacata ggcggccgct aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta 1200
 aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt 1260
 aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 1320
 aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 1380
 tatcatgtct accggataaa cttcgtataa tgtatactat acgaagttag ccggtagggc 1440
 ccctctcttc atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgctt 1500
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 1560
 tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 1620
 cctcgtgcmc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc 1680
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt 1740
 cgttcgtccc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagacc gctgcgcctt 1800
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 1860
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 1920
 gtggtgccct aactacggct acactagaag aacagtatth ggtatctgag ctctgctgaa 1980
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 2040
 tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcmc agaaaaaaag gatctcaaga 2100
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtggt aacgaaaact cacgttaagg 2160
 gattttggtc atgggcgcmc ctcatactcc tgcagggcatg agattatcaa aaaggatctt 2220
 cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta 2280
 aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct 2340

ES 2 805 526 T3

atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg 2400
 cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga 2460
 tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt 2520
 atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg ccggaagct agagtaagta gttcggcagt 2580
 taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcadc gtggtgtcac gctcgtcgtt 2640
 tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat 2700
 gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcg tctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc 2760
 cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc 2820
 cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat 2880
 gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgc aatacgggat aatactgccc cacatagcag 2940
 aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caagatcct 3000
 accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc 3060
 ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaa 3120
 ggaataaagg gcgacacgga aatggtgaat actcactc ttcctttttc aatattattg 3180
 aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaa 3240
 taacaaata ggggttcgc gcacatttcc ccgaaaagt ccacctgacg tcaggtacac 3300
 aacttcgtat agcatacatt atacgaagt atggtaccaa gcctaggcct ccaaaaaagc 3360
 ctctcacta cttctggaat agctcagagg cagaggcggc ctggcctct gcataaataa 3420
 aaaaaattag tcagccatgg ggcggagaat gggcggaact gggcggagt aggggcggga 3480
 tgggcggagt tagggcggg actatggtg ctgactaatt gagatgcatg ctttgcatc 3540
 ttctgcctgc tggggagcct ggggactttc cacacctggt tgctgactaa ttgagatgca 3600
 tgctttgcat acttctgct gctggggagc ctggggactt tccacaccgg atccaccatg 3660
 ggttcagcta ttgagcagga tgggttgcac gctggtagtc ccgccgatg ggtcgaacga 3720
 ctggttgat acgattgggc ccaacagact ataggctgtt ccgacgctgc tgcctttcgt 3780
 ctttctgcac aaggtcgtcc agttctgttc gtgaaaaccg acttgtccgg agccctcaat 3840
 gagttgcaag acgaagctgc acgactgagt tggcttgcca ccaactggtg cccatgtgcc 3900
 gcagtacttg acgtcgtcac agaggctggt cgcgattggt tgctccttgg agaagtgcc 3960
 ggccaagatc ttctcagttc ccacctgccc cctgccgaaa aagtttcaat aatggctgac 4020
 gctatgagaa ggctgcacac ccttgaccct gccacatgtc cattcgatca ccaagccaaa 4080
 caccgaattg aacgagctag aaccgcgatg gaagccggcc tcgttgatca agacgatttg 4140
 gatgaggaac accaggtct cgcaccgct gaactcttcg ctgcctcaa agcacgaatg 4200
 ccagacggag atgacttggc cgtaaccac ggagatgct gccttcctaa cataatggta 4260

ES 2 805 526 T3

gagaatgaa gatttagcgg cttcattgat tgtggacgac ttggagttgc agatcggtag 4320
caagatatcg ctctcgctac cagagatatt gctgaagaat tgggcggaga atgggctgat 4380
cggtttctcg tactctacgg aattgccgca cctgattccc aacgcattgc tttttaccgt 4440
cttctggatg agttcttcta aacgcgtccc ccctctccct ccccccccc taacgttact 4500
ggccgaagcc gcttgaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt ttccaccata 4560
ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt gacgagcatt 4620
cctaggggtc tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt cgtgaaggaa 4680
gcagttcctc tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct ttgcaggcag 4740
cggaaacccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt ataagataca 4800
cctgcaaagg cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt ggaaagagtc 4860
aaatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtaccccat 4920
tgtatgggat ctgatctggg gcctcgggtc acatgcttta catgtgttta gtcgaggtta 4980
aaaaacgtct aggccccccg aaccacgggg acgtggtttt ctttgaaaa acacgattgc 5040
tcgaatcacc atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt 5100
cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga 5160
tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggaagc tgcccgtgcc 5220
ctggcccacc ctcgtgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga 5280
ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg 5340
caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg 5400
cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat 5460
cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa 5520
gcagaagaac ggcacaaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt 5580
gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgtgcc 5640
cgacaaccac tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcg 5700
tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct 5760
gtacaagtaa tcggccgcta atcagccata ccacatttgt agaggtttta cttgctttaa 5820
aaaacctccc acacctccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttgta 5880
acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 5940
ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgc caaactcatc aatgtatctt 6000
atcatgtcgg cgcggtgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg 6060
tcattagttc atagccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aatggcccc 6120

ES 2 805 526 T3

cctggctgac cgcccaacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata 6180
 gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaaactgcc 6240
 cacttgacag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac 6300
 ggtaaatggc cgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt tctacttgg 6360
 cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc 6420
 aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttcaa gtctccacc cattgacgtc 6480
 aatgggagtt tgttttgca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc 6540
 gccccattga cgcaaatggg cggtagcgt gtacgggtgg aggtctatat aagcagagct 6600
 ctccctatca gtgatagaga tctccctatc agtgatagag atcgtcgacg tttagtgaac 6660
 cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac 6720
 cgatccagcc tccgcggccg ggaacggtgc attggaacgc ggattccccg tgccaagagt 6780
 gacgtaagta ccgcctatag agtctatagg cccaccccct tggcttctta tgcagtctat 6840
 actgtttttg gcttggggtc tatacacc cgttctctca tgttataggt gatggtatag 6900
 cttagcctat aggtgtgggt tattgacct tattgaccac tcccctattg gtgacgatac 6960
 tttcattac taatccataa catggctctt tgccacaact ctctttattg gctatatgcc 7020
 aatacactgt ccttcagaga ctgacacgga ctctgtatct ttacaggatg gggctctcatt 7080
 tattatttac aaattcacat atacaacacc accgtcccca gtgcccgcag tttttattaa 7140
 acataacgtg ggatctccac gcgaatctcg ggtacgtggt ccggacatgg tctcttctcc 7200
 ggtagcggcg gagcttctac atccgagccc tgctcccatg cctccagcga ctcatggtcg 7260
 ctccggcagct ccttgctcct aacagtggag gccagactta ggcacagcac gatgccacc 7320
 accaccagtg tgccgcacaa ggccgtggcg gtagggtatg tgtctgaaaa tgagctcggg 7380
 gagcgggctt gcaccgctga cgcatttggga agacttaagg cagcggcaga agaagatgca 7440
 ggcagctgag ttgttggtgct ctgataagag tcagaggtaa ctcccgttgc ggtgctgcta 7500
 acggtggagg gcagtgtagt ctgagcagta ctcggtgctg ccgocgcgc caccagacat 7560
 aatagctgac agactaacag actgttcctt tccatgggtc ttttctgcag tcaccgtcct 7620
 tgacacg 7627

5 <210> 24
 <211> 2669
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético
 <400> 24

agcctaggcc tccaaaaaag cctcctcact acttctggaa tagctcagag gcagagggcg 60

ES 2 805 526 T3

cctcggcctc tgcataaata aaaaaaatta gtcagccatg gggcggagaa tgggcggaac 120
 tgggcggagt taggggcggg atgggcggag ttaggggcgg gactatggtt gctgactaat 180
 tgagatgcat gctttgcata cttctgcctg ctggggagcc tggggacttt ccacacctgg 240
 ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag cctggggact 300
 ttccacaccg gatccaccat gggttcagct attgagcagg atggggtgca tgctggtagt 360
 cccgccgcat gggtcgaacg actgtttgga tacgattggg cccaacagac tataggctgt 420
 tccgacgctg ctgtctttcg tctttctgca caaggtcgtc cagtctgtt cgtgaaaacc 480
 gacttgccg gagccctcaa tgagttgcaa gacgaagctg cacgactgag ttggcttgcc 540
 accactggtg tcccatgtgc cgcagtactt gacgtcgtca cagaggctgg tcgcgattgg 600
 ttgctcctg gagaagtgcc cggccaagat cttctcagtt cccaccttgc ccctgccgaa 660
 aaagtttcaa taatggctga cgctatgaga aggctgcaca ccctgacctg gccacatgt 720
 ccattcgatc accaagccaa acaccgaatt gaacgagcta gaaccgcat ggaagccggc 780
 ctggtgatc aagacgattt ggatgaggaa caccagggtc tcgcaccgct tgaactcttc 840
 gctcgcctca aagcacgaat gccagacgga gatgacttgg tcgtaacca cggagatgcc 900
 tgccttccta acataatggt agagaatgga agatttagcg gcttcattga ttgtggacga 960
 cttggagttg cagatcggtg ccaagatata gctctcgcta ccagagatat tgctgaagaa 1020
 ttgggcggag aatgggctga tcggtttctc gtactctacg gaattgccgc acctgattcc 1080
 caacgcattg ctttttaccg tcttctggat gagttcttct aaacgcgtcc cccctctccc 1140
 tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg tgcgtttgtc 1200
 tataatgtat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg gaaacctggc 1260
 cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttcccctc tcgccaagg aatgcaagg 1320
 ctggtgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca aacaacgtct 1380
 gtagcgacct tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct ctgcgccaa 1440
 aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtcca cgttgtagt 1500
 tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg tattcaaca ggggctgaag 1560
 gatcccaga aggtaccca ttgtatggga tctgatctgg gcctcgggtg cacatgcttt 1620
 acatgtggtt agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggtt 1680
 tcctttgaaa aacacgattg ctogaatcac catggtgagc aaggcgagg agctgttcac 1740
 cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt 1800
 gtccggcgag ggcgagggcg atgccacctc cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac 1860
 caccggcaag ctgccctgct cctggcccac cctcgtgacc acctcggct acggcctgca 1920

ES 2 805 526 T3

gtgcttcgcc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt cgcctatgcc 1980
 cgaaggctac gtccaggagc gcacatcctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg 2040
 cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga 2100
 cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa 2160
 cgtctatata atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 2220
 caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg 2280
 cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg ccctgagcaa 2340
 agacccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat 2400
 cactctcggc atggacgagc tgtacaagta atcgccgct aatcagccat accacatttg 2460
 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 2520
 tgaatgcaat tgttgttggt aacttgctta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 2580
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt 2640
 ccaaactcat caatgtatct tatcatgtc 2669

<210> 25
 <211> 3003
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 25

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60
 gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120
 ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
 atcaagtgta tcatatgccca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc 300
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
 tattagtcac cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420
 agcggtttga ctcaocgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480
 tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtogtaa caactccgcc ccatgacgc 540
 aaatgggccc taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctctc cctatcagtg 600
 atagagatct ccctatcagt gatagagatc gtcgacggtt agtgaaccgt cagatcgcc 660
 ggagacgccca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga tccagcctcc 720
 gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgac gtaagtaccg 780
 cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc atgctatact gtttttggct 840

ES 2 805 526 T3

tggggctctat acacccccgc ttcctcatgt tataggtgat ggtatagctt agcctatag 900
 tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg acgatacttt ccattactaa 960
 tccataacat ggctccttgc cacaactctc tttattggct atatgccaat aactgtcct 1020
 tcagagactg acacggactc tgtatthtta caggatgggg tctcatttat tatttacaaa 1080
 ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt ttattaaaca taacgtggga 1140
 tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatggctct cttctccggg agcggcggag 1200
 cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc atggtcgctc ggagctcct 1260
 tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat gccaccacc accagtgtgc 1320
 cgcacaaggc cgtggcggta gggatgtgt ctgaaaatga gctcggggag cgggcttgca 1380
 ccgctgacgc atttggaaga ctttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg 1440
 ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggg gctgttaacg gtggagggca 1500
 gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac cagacataat agctgacaga 1560
 ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca ccgtccttga cacgaagctt 1620
 atactcgagc tctagattgg gaaccgggt ctctcgaatt cgagatctcc accatgcaca 1680
 gacctagacg tcgtggaact cgtccacctc cactggcact gctcgtgct ctctcctgg 1740
 ctgcacgtgg tgctgatgca caagtacaac tgcaacaaag cggagctgaa ctggccaaac 1800
 caggcgcttc cgtgaagatg tcttgtaaag ccagcgggta tacatttact aattactgga 1860
 ttcactggga gaagcaaaga cctgaacagg gattggaatg gattggatac attaactcta 1920
 acaccggaca cacagagtat aatcaaaaat tcaaggataa ggccaccctc acagccgaca 1980
 gatcttcttc aaccgcctat atgcaacttt cttccctcac ttctgaagac tccgcagttt 2040
 acttttgcc acgaacttat tctggaagct cccatttcga ctactggggg caaggaacaa 2100
 cactgatcgt gtctagcggc ggcggagggt ccggcggggg cggtagcggg ggcggagggt 2160
 ctgatattgt catgactcaa acacctgtct ctctgcctgt ttcacttgga gatcaagcta 2220
 gcatttcctg ccgctctagt caatctctcg tccacaacaa cggcgatact ttcttgcat 2280
 ggtatctgca gaaaccaggt cagtcaccta aactgcttat atacaaagtc tctaatagat 2340
 tctcaggggt gccagatcga ttcagtggtt ctgggtccgg tacagattht aactcaaga 2400
 tatccagagt agaagcagaa gatctgggcg tgtatthctg cagtcaaaca aacttattc 2460
 ctcgtacttt tggaggcggg acaaaactgg agatcaagcg tggaggcggg gggagtgtt 2520
 tgtthtatct ggccgttggg ataatgtthc tcgtaaatac agtactthgg gtaacaataa 2580
 ggaaggaact gaagagaaaag aaaaaatggg atctggaaat atcattggac agtggacacg 2640
 aaaaaaagt cacatcatca ttgcaagaag accggcactt ggaggaggaa ctgaaatgtc 2700

ES 2 805 526 T3

aagagcaaaa	agaagaacaa	ctgcaagaag	gcgtacatag	aaaagaacca	cagggagcaa	2760
cataggcggc	cgctaatacag	ccataccaca	tttgtagagg	ttttacttgc	tttaaaaaac	2820
ctcccacacc	tccccctgaa	cctgaaacat	aaaatgaatg	caattgttgt	tgттаacttg	2880
tttattgcag	ottataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	2940
gcattttttt	cactgcattc	tagttgtggt	ttgtccaaac	tcatcaatgt	atcttatcat	3000
gtc						3003

<210> 26

<211> 208

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

ES 2 805 526 T3

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 1 5 10 15

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 20 25 30

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 35 40 45

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 50 55 60

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 65 70 75 80

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 85 90 95

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 100 105 110

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 115 120 125

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 130 135 140

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 145 150 155 160

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 165 170 175

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 180 185 190

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 195 200 205

<210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
 1 5

ES 2 805 526 T3

5 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Ile Asn Pro Asn Thr Gly His Thr
 1 5

10 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 29

Cys Ala Arg Thr Tyr Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr
 1 5 10

20 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 30

Ser Leu Val His Asn Asn Gly Asp Thr Phe
 1 5 10

30 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 31

Ser Gln Thr Thr Leu Ile Pro Arg Thr
 1 5

40 <210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
 1 5

45 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 33

ES 2 805 526 T3

Ile Leu Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr
1 5 10

5 <210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

10 Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

20 Gln Ser Leu Leu
1

25 <210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

30 His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
1 5

35 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
1 5

40 <210> 38
<211> 122
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 38

ES 2 805 526 T3

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

Ser His Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

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

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

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met
 65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 39

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

10

ES 2 805 526 T3

50

55

60

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

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

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

<210> 40
<211> 452
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 40

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

Ser His Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

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

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met
65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr Trp
100 105 110

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

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser
130 135 140

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

Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro

10

ES 2 805 526 T3

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
 420 425 430

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg
 435 440 445

Thr Pro Gly Lys
 450

<210> 41
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 41

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

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

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160

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

10

ES 2 805 526 T3

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

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 42
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 42

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro Gly Asp Lys Thr
 20 25 30

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 35 40 45

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 50 55 60

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 65 70 75 80

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 85 90 95

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 115 120 125

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 130 135 140

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 145 150 155 160

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 165 170 175

10

ES 2 805 526 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 180 185 190

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 195 200 205

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 210 215 220

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 225 230 235 240

Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245 250 255

<210> 43
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 43

ES 2 805 526 T3

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

ES 2 805 526 T3

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

<210> 44
 <211> 7633
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 44

ES 2 805 526 T3

aagcttatac tcgagctcta gattgggaac ccgggtctct cgaattcgag atctccacca 60
tgcacagacc tagacgtcgt ggaactcgtc cacctccact ggcactgctc gctgctctcc 120

ES 2 805 526 T3

tcctggctgc acgtggtgct gatgcagagg tgcagctggt ggagtctggg ggagccatag 180
 taaagccggg ggggtcccat agagtctcct gtgaagcctc tggattcact ttcagtaacg 240
 cctggatgag ttgggtccgc caggctccag ggagggggct ggagtgggtt ggccgtattt 300
 taagcaagac tgatggtggg acgacagact acgctgcacc cgtgaaagac agattcacca 360
 tttcaagaga tgattctaaa aatatgttgt ttctgcaaat ggacagcctg aaaatcgagg 420
 acacagccgt gtatttctgt accacggccg atttttggag tgcttattct tctgactact 480
 ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct caggaggtgg aggttccggg ggcgggggct 540
 ccggcgaggg tggatcagat attgtgatga ctcagtctcc actctccctg cccgtcaccc 600
 ctggagagcc ggctccatc tcctgcaggt ctagtccagc cctcctgcat agtaatgggt 660
 acaactatth ggattggtac ctacagaagc cagggcagtc tccacaactc ctgatctatt 720
 tgggttctaa tcgggcctcc ggggtccctg acaggttcag tggcagtgga tcaggcacag 780
 attttacact gaaaatcagc agaatggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgcatgc 840
 aaggtctaca aactccgtac acttttgcc aggggaccaa gctggagatc aaaggaggcg 900
 gagggagtgt tttgttttat ctggccgttg ggataatggt tctcgtaaat acagtacttt 960
 gggtacaat aaggaaggaa ctgaagagaa agaaaaaatg ggatctggaa atatcattgg 1020
 acagtggaca cgaaaaaaaa gtcacatcat cattgcaaga agaccggcac ttggaggagg 1080
 aactgaaatg tcaagagcaa aaagaagaac aactgcaaga aggcgtacat agaaaagaac 1140
 cacagggagc aacataggcg gccgctaata agccatacca cattttaga ggttttactt 1200
 gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattggt 1260
 gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat 1320
 ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgcctaa actcatcaat 1380
 gtatcttata atgtctaccg gtataacttc gtataatgta tactatacga agttagccgg 1440
 tagggcccct ctcttcatgt gagcaaaaag ccagcaaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc 1500
 cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 1560
 ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagc actataaaga taccaggcgt tccccctgg 1620
 aagctccctc gtgcgctctc ctggtccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 1680
 tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt 1740
 gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc ccgaccgctg 1800
 cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact 1860
 ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt 1920
 cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct 1980

ES 2 805 526 T3

gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 2040
cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgagaa aaaaaggatc 2100
tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg 2160
ttaagggatt ttggtcatgg gcgcgctca tactcctgca ggcatgagat tatcaaaaag 2220
gatcttcacc tagatccttt taaattaata atgaagtttt aatcaatct aaagtatata 2280
tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat 2340
ctgtctatth cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg 2400
ggagggctta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc 2460
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggctctgc 2520
aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgccgg gaagctagag taagtagttc 2580
gccagttaat agtttgca acggtgttgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc 2640
gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc 2700
ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa 2760
gttgccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat 2820
gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat tctgagaata 2880
gtgtatgagg cgaccgagtt gctcttgcgc ggcgtcaata cgggataata ctgcgccaca 2940
tagcagaact taaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag 3000
gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc 3060
agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc 3120
aaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata 3180
ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta 3240
gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcag 3300
gtacacaact tcgtatagca tacattatac gaagttatgg taccaagcct aggcctccaa 3360
aaaagcctcc tcaactctc tggaatagct cagaggcaga ggccgctcgc gcctctgcat 3420
aaataaaaaa aattagtcag ccatggggcg gagaatgggc ggaactgggc ggagttaggg 3480
gcgggatggg cggagttagg ggcgggacta tggttgctga ctaattgaga tgcatgcttt 3540
gcatacttct gcctgctggg gagcctgggg actttccaca cctgggtgct gactaattga 3600
gatgcatgct ttgcatactt ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca caccgatcc 3660
accatggggt cagctattga gcaggatggg ttgcatgctg gtagtcccgc cgcattgggtc 3720
gaacgactgt ttggatacga ttggcccaa cagactatag gctggtccga cgtgctgctc 3780
tttctcttt ctgcacaagg tcgtccagtt ctggtcgtga aaaccgactt gtccggagcc 3840
ctcaatgagt tgcaagacga agctgcacga ctgagttggc ttgccaccac tgggtgctcca 3900

ES 2 805 526 T3

tgtgccgcag tacttgacgt cgtcacagag gctggtcgcg attggttgct ccttgagaaa	3960
gtgcccggcc aagatcttct cagttcccac cttgcccctg ccgaaaaagt ttcaataatg	4020
gctgacgcta tgagaaggct gcacaccctt gaccctgccca catgtccatt cgatcaccaa	4080
gccaaacacc gaattgaacg agctagaacc cgcatggaag ccggcctcgt tgatcaagac	4140
gatttgatg aggaacacca gggctctgca cccgctgaac tcttcgctcg cctcaaagca	4200
cgaatgccag acggagatga cttggtcgta acccacggag atgcctgcct tcctaacata	4260
atggtagaga atggaagatt tagcggcttc attgattgtg gacgacttgg agttgcagat	4320
cggtaccaag atatcgctct cgctaccaga gatattgctg aagaattggg cggagaatgg	4380
gctgatcggt ttctcgtact ctacggaatt gccgcacctg attcccacg cattgctttt	4440
taccgtcttc tggatgagtt cttctaaacg cgtccccctt ctccctccc cccccctaac	4500
gttactggcc gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtcgt ttgtctatat gttattttcc	4560
accatattgc cgtcttttgg caatgtgagg gcccgaaaac ctggccctgt cttcttgacg	4620
agcattccta ggggtcttcc ccctctcgcc aaaggaatgc aaggtctggt gaatgtcgtg	4680
aaggaagcag ttctctgga agcttcttga agacaaaca cgtctgtagc gacccttgc	4740
aggcagcggg accccccacc tggcgacagg tgcctctgcg gccaaaagcc acgtgtataa	4800
gatacacctg caaaggcggc acaaccccag tgccacgctg tgagttggat agttgtggaa	4860
agagtcaaat ggctctcctc aagcgtattc aacaaggggc tgaaggatgc ccagaaggta	4920
ccccattgta tgggatctga tctggggcct cgggtgcacat gctttacatg tgtttagtcg	4980
aggttaaaa acgtctaggc cccccgaacc acggggacgt ggttttcctt tgaaaaacac	5040
gattgctcga atcaccatgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat	5100
cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga	5160
gggcgatgcc acctacggca agctgacct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc	5220
cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacctt cggctacggc ctgcagtgct tcgcccgcta	5280
ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgccogaag gctacgtcca	5340
ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt	5400
cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg	5460
caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc	5520
cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg	5580
cagcgtgcag ctgcccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct	5640
gctgcccgac aaccactacc tgagctacca gtccgcccctg agcaaagacc ccaacgagaa	5700
gcgcgatcac atggctcctg tggagtctgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga	5760

ES 2 805 526 T3

cgagctgtac aagtaatcgg ccgctaata gccataccac atttgtagag gttttacttg 5820
ctttaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattggtg 5880
ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaata aagcaatagc atcacaaatt 5940
tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggg tttgtccaaa ctcatcaatg 6000
tatcttatca tgtcggcgcg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt 6060
acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat 6120
ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatggt 6180
cccatagtaa cgccaatag gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa 6240
actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgcca gtacgcccc tattgacgtc 6300
aatgacggta aatggcccg ctaggcattat gcccagtaca tgacctatg ggactttcct 6360
acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggatgatgc gttttggcag 6420
tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt 6480
gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgctgtaac 6540
aactccgccc cattgacgca aatggcggtt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc 6600
agagctctcc ctatcagtga tagagatctc cctatcagtg atagagatcg tcgacgttta 6660
gtgaaccgct agatcgctcg gagacgcat ccacgctggt ttgacctcca tagaagacac 6720
cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa cgggtgattg gaacgcggat tccccgtgcc 6780
aagagtgcag taagtaccgc ctatagagtc tataggccca cccccttggc ttcttatgca 6840
tgctatactg tttttggctt ggggtctata caccccgct tcctcatggt ataggtgatg 6900
gtatagctta gcctataggt gtgggttatt gaccattatt gaccactccc ctattggtga 6960
cgatactttc cactactaat ccataacatg gctctttgcc acaactctct ttattggcta 7020
tatgccaata cactgtcctt cagagactga cacggactct gtatttttac aggatggggt 7080
ctcatttatt atttacaaat tcacatatac aacaccaccg tcccagtgcc ccgcagtttt 7140
tattaaacat aacgtgggat ctccacgca atctcgggta cgtgttccgg acatggtctc 7200
ttctccggta gcggcggagc ttctacatcc gagccctgct cccatgcctc cagcgactca 7260
tggtcgcctc gcagctcctt gtccttaaca gtggaggcca gacttaggca cagcacgatg 7320
cccaccacca ccagtgtgcc gcacaaggcc gtggcggtag ggtatgtgtc tgaaaatgag 7380
ctcggggagc gggcttgca cgcctgacga tttggaagac ttaaggcagc ggcagaagaa 7440
gatgcaggca gctgagttgt tgtgttctga taagagtcag aggtaactcc cgttcgggtg 7500
ctgttaacgg tggagggcag tgtagtctga gcagtactcg ttgctgccgc gcgcgccacc 7560
agacataata gctgacagac taacagactg ttcctttcca tgggtctttt ctgcagtcac 7620
cgtccttgac acg 7633

<210> 45
<211> 1011
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

ES 2 805 526 T3

<220>
<223> sintético

<400> 45

5

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagcc atagtaaagc cggggggggtc ccatagagtc      60
tcctgtgaag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagttgggt cggccaggct      120
ccagggaggg ggctggagtg ggttggccgt attttaagca agactgatgg tgggacgaca      180
gactacgctg cacccgtgaa agacagattc accatttcaa gagatgattc taaaaatatg      240
ttgtttctgc aatggacag cctgaaaatc gaggacacag ccgtgtattt ctgtaccacg      300
gccgattttt ggagtgetta ttctctgac tactggggcc agggaaccct ggtcacctgc      360
tcctcaggag gtggaggttc cgggggcggg ggctccggcg gaggtggatc agatattgtg      420
atgactcagt ctccactctc cctgcccgtc acccctggag agccggcctc catctcctgc      480
aggctagtc agagcctcct gcatagtaat gggtaacaact atttggattg gtacctacag      540
aagccagggc agtctccaca actcctgac tatttgggtt ctaatcgggc ctccggggtc      600
cctgacaggt tcagtggcag tggatcaggc acagatttta cactgaaaat cagcagaatg      660
gaggtgagg atgttgggggt ttattactgc atgcaagtc taaaaactcc gtactctttt      720
ggccagggga ccaagctgga gatcaaagga ggcggagga gtgttttgtt ttatctggcc      780
gttgggataa tgtttctcgt aaatacagta ctttgggtaa caataaggaa ggaactgaag      840
agaaaagaaa aatgggatct ggaaatatca ttggacagtg gacacgaaaa aaaagtcaca      900
tcatcattgc aagaagaccg gcacttggag gaggaactga aatgtcaaga gcaaaaagaa      960
gaacaactgc aagaaggcgt acatagaaaa gaaccacagg gagcaacata g      1011

```

<210> 46
<211> 2669
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> sintético

<400> 46

15

```

agcctaggcc tcaaaaaaag cctcctcact acttctggaa tagctcagag gcagaggcgg      60
cctcggcctc tgcataaata aaaaaatta gtcagccatg ggcggagaa tgggcggaac      120
tgggcggagt tagggcggg atgggcggg ttagggcgg gactatggtt gctgactaat      180
tgagatgcat gctttgcata cttctgcctg ctggggagcc tggggacttt ccacacctgg      240

```

ES 2 805 526 T3

ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tactttctgcc tgctggggag cctggggact 300
 ttccacaccg gatccaccat gggttcagct attgagcagg atggggtgca tgctggtagt 360
 cccgccgcat gggtcgaacg actgtttga tacgattggg cccaacagac tatagctgt 420
 tccgaogctg ctgtctttcg tctttctgca caaggtcgtc cagttctgtt cgtgaaaacc 480
 gacttgtccg gagccctcaa tgagttgcaa gacgaagctg cacgactgag ttggcttgcc 540
 accactgggtg tcccatgtgc cgcagtactt gacgtcgtca cagaggctgg tcgcgattgg 600
 ttgctccttg gagaagtgcc cggccaagat cttctcagtt cccaccttgc ccctgccgaa 660
 aaagtttcaa taatggctga cgctatgaga aggtgcaca ccottgacct tgccacatgt 720
 ccattcgatc accaagccaa acaccgaatt gaacgagcta gaacccgcat ggaagccggc 780
 ctcgttgatc aagacgattt ggatgaggaa caccagggtc tcgcacccgc tgaactcttc 840
 gctcgcctca aagcacgaat gccagacgga gatgacttgg tcgtaacca cggagatgcc 900
 tgccttccta acataatggt agagaatgga agatttagcg gcttcattga ttgtggacga 960
 cttggagttg cagatcggtc ccaagatata gctctcgcta ccagagatat tgctgaagaa 1020
 ttgggcgagg aatgggctga tcggtttctc gtactctacg gaattgccgc acctgattcc 1080
 caacgcattg ctttttaccg tcttctggat gatttcttct aaacgcgtcc cccctctccc 1140
 tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggat aaggccggtg tgcgtttgtc 1200
 tatatgttat tttccacat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg gaaacctggc 1260
 cctgtcttct tgacgagcat tcctaggggt ctttcccctc tcgccaaagg aatgcaaggt 1320
 ctggtgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca aacaacgtct 1380
 gtagcgacct tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct ctgcggccaa 1440
 aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtcca cgttgtgagt 1500
 tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg tattcaacaa ggggctgaag 1560
 gatgcccaga aggtacccca ttgtatggga tctgatctgg ggctcgggtg cacatgcttt 1620
 acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt 1680
 tcctttgaaa aacacgattg ctccaatcac catggtgagc aagggcgagg agctgttcc 1740
 cggggtgggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt 1800
 gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcactcgcac 1860
 caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accttcggct acggcctgca 1920
 gtgcttcgcc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc 1980
 cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg 2040
 cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga 2100
 cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa 2160

ES 2 805 526 T3

cgtctatatc atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca 2220
 caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg 2280
 cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg cctgagcaa 2340
 agaccccaac gagaagcgcg atcacatggg cctgctggag ttcgtgaccg ccgcccggat 2400
 cactctcggc atggacgagc tgtacaagta atcggccgct aatcagccat accacatttg 2460
 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 2520
 tgaatgcaat tgttgttggt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 2580
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttccact gcattctagt tgtggtttgt 2640
 ccaaactcat caatgtatct tatcatgtc 2669

<210> 47
 <211> 2992
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 47

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60
 gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc 120
 ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
 atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc 300
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
 tattagtoat cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420
 agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480
 tttggcacca aatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 540
 aaatgggocg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctctc cctatcagtg 600
 atagagatct ccctatcagt gatagagatc gtcgacgttt agtgaaccgt cagatcgctt 660
 ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga tccagcctcc 720
 gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga tccccgtgc caagagtgc gtaagtaccg 780
 cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc atgctatact gtttttggct 840
 tggggtctat acacccccgc ttcctcatgt tataggatg ggtatagctt agcctatagg 900
 tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggt acgatacttt ccattactaa 960
 tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct atatgccaat aactgtcct 1020

ES 2 805 526 T3

tcagagactg acacggactc tgtatTTTTa caggatgggg tctcatttat tatttaciaa 1080
 ttcacata caacaccacc gtccccagtG cccgcagttt ttattaaaca taacgtggga 1140
 tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatggctt cttctccggt agcggcggag 1200
 cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc atggctcgctc ggcagctcct 1260
 tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat gccaccacc accagtgtgc 1320
 cgacaaggc cgtggcggta gggatgtgt ctgaaaatga gctcggggag cgggcttgca 1380
 ccgctgacgc atttggaga cttaaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg 1440
 ttgtgttctg ataagagtca gagtaactc ccgttgcggt gctgttaacg gtggagggca 1500
 gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac cagacataat agctgacaga 1560
 ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagaag cttatactcg agctctagat 1620
 tgggaacccg ggtctctcga attcgagatc tccaccatgc acagacctag acgtcgtgga 1680
 actcgtccac ctccactggc actgctogct gctctcctcc tggctgcacg tgggtctgat 1740
 gcagaggtgc agctgggtgga gtctggggga gccatagtaa agccgggggg gtcccataga 1800
 gtctcctgtg aagcctctgg attcactttc agtaacgcct ggatgagttg ggtccgccag 1860
 gctccagga gggggctgga gtgggtggc cgtatTTTTa gcaagactga tggggggacg 1920
 acagactacg ctgcacccgt gaaagacaga ttcaccattt caagagatga ttctaaaaat 1980
 atgttgtttc tgcaaatgga cagcctgaaa atcgaggaca cagccgtgta tttctgtacc 2040
 acggccgatt tttggagtgc ttattcttct gactactggg gccagggaac cctggtcacc 2100
 gtctcctcag gaggtggagg ttccgggggc gggggctccg gcggaggtgg atcagatatt 2160
 gtgatgactc agtctccact ctccctgcc gtcaccctg gagagccggc ctccatctcc 2220
 tgcaggtcta gtcagagcct cctgcatagt aatgggtaca actatTTGga ttggtacct 2280
 cagaagccag ggcagtctcc acaactcctg atctatTTGg gttctaactg ggcctccggg 2340
 gtccctgaca ggttcagtgg cagtggatca ggcacagatt ttacactgaa aatcagcaga 2400
 atggaggctg aggatgttgg ggtttattac tgcattgcaag gtctacaaac tccgtacct 2460
 tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa ggaggcggag ggagtgtttt gttttatctg 2520
 gccgttggga taatgtttct cgtaaataca gtactttggg taacaataag gaaggaactg 2580
 aagagaaaga aaaaatggga tctggaaata tcattggaca gtggacacga aaaaaagtc 2640
 acatcatcat tgcaagaaga ccggcacttg gaggaggaac tgaaatgtca agagcaaaaa 2700
 gaagaacaac tgcaagaagg cgtacataga aaagaaccac agggagcaac ataggcggcc 2760
 gctaatacagc cataccacat ttgtagaggt tttacttget ttaaaaaacc tcccacacct 2820
 cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt ttattgcagc 2880
 ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaaattc acaataaag catttttttc 2940

actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tc

2992

ES 2 805 526 T3

<210> 48
 <211> 5765
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintético

10

<400> 48

```

acaacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatggtacc aagcctaggc ctccaaaaaa      60
gcctcctcac tacttctgga atagctcaga ggagagggcg gcctcggcct ctgcataaat      120
aaaaaaaaatt agtcagccat ggggcggaga atgggcggaa ctgggcggag ttaggggcgg      180
gatgggcgga gttagggcg ggactatggt tgctgactaa ttgagatgca tgctttgcat      240
acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacacctg gttgctgact aattgagatg      300
catgctttgc atacttctgc ctgctgggga gcctggggac tttccacacc ggatccacca      360
tgggttcagc tattgagcag gatggggttc atgctggtag tcccgcgcga tgggtcgaac      420
gactgtttgg atacgattgg gcccaacaga ctataggctg ttccgacgct gctgtctttc      480
gtctttctgc acaaggtcgt ccagttctgt tcgtgaaaac cgacttgtcc ggagccctca      540
atgagttgca agacgaagct gcacgactga gttggcttgc caccactggt gtcccatgtg      600
ccgcagtact tgacgtcgtc acagaggctg gtcgcgattg gttgctcctt ggagaagtgc      660
ccggccaaga tcttctcagt tcccaccttg cccctgccga aaaagtttca ataatggctg      720
acgctatgag aaggctgcac acccttgacc ctgccacatg tccattcgat caccaagcca      780
aacaccgaat tgaacgagct agaaccgcga tgggaagccg cctcgttgat caagacgatt      840
tggatgagga acaccagggt ctgcacccg ctgaactctt cgctcgcctc aaagcacgaa      900
tgccagacgg agatgacttg gtcgtaacct acggagatgc ctgccttcct aacataatgg      960
tagagaatgg aagatttagc ggcttcattg attgtggacg acttggagtt gcagatcggg      1020
accaagatat cgctctcgtc accagagata ttgctgaaga attgggcgga gaatgggctg      1080
atcggtttct cgtactctac ggaattgccg cacctgattc ccaacgcatt gctttttacc      1140
gtcttctgga tgagttcttc taaacgggtc cccctctctc ctccccccc cctaacgtta      1200
ctggccgaag ccgcttgaa taaggccggg gtgctgttct ctatatgtta tttccacca      1260
tattgccgtc ttttgcaat gtgagggccc gaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca      1320
ttcctagggg tctttccctc ctgcgcaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg      1380
aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc      1440
agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata      1500
    
```

ES 2 805 526 T3

cacctgcaaa ggcggcaciaa ccccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag 1560
tcaaatggct ctcccaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc 1620
attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtggt tagtcgaggt 1680
taaaaaacgt ctaggccccc cgaaccacgg ggacgtgggt ttcctttgaa aaacacgatt 1740
gctcgaatca ccatgggtgag caagggcgag gagctgttca ccgggggtgg gcccatcctg 1800
gtcgaagctg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgcgggcca gggcgagggc 1860
gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcacatgca ccaccggcaa gctgcccggtg 1920
ccctggccca ccctcgtgac caccttcggc tacggcctgc agtgcttcgc ccgctacccc 1980
gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag 2040
cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacct gcgcccaggt gaagttcgag 2100
ggcgacaccc tggggaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac 2160
atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac 2220
aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc 2280
gtcgagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccacg gcgacggccc cgtgctgctg 2340
cccgacaacc actacctgag ctaccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc 2400
gatcacatgg tccctgctgga gttcgtgacc gccgcgggga tcaactctcg catggacgag 2460
ctgtacaagt aatcgccgcg taatcagcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt 2520
aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt 2580
taacttgttt attcgagctt ataattggtt caaataaagc aatagcatca caaatccac 2640
aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtgggttg tccaaactca tcaatgtatc 2700
ttatcatgtc ggcgcgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg 2760
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 2820
cgctggctg accgcccac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 2880
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 2940
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt gacgtcaatg 3000
acggtaaatg gccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 3060
ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggg gatgcggttt tggcagtaca 3120
tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 3180
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 3240
ccgcccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat ataagcagag 3300
ctctccctat cagtgataga gatctcccta tcagtgatag agatcgtcga cgtttagtga 3360
accgtcagat cgctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccggg 3420

ES 2 805 526 T3

accgatccag cctccgcggc cgggaacggt gcattggaac gcggattccc cgtgccaaaga 3480
 gtgacgtaag taccgcctat agagtctata ggcccacccc cttggcttct tatgcatgct 3540
 atactgtttt tggcttgagg tctatacacc cccgcttcct catgttatag gtgatggat 3600
 agcttagcct ataggtgtgg gttattgacc attattgacc actcccctat tggtgacgat 3660
 actttccatt actaatccat aacatggctc tttgccacaa ctctctttat tggctatatg 3720
 ccaatacact gtccttcaga gactgacacg gactctgtat ttttacagga tggggctctca 3780
 tttattattt acaaattcac atatacaaca ccaccgtccc cagtgcccg c agtttttatt 3840
 aaacataacg tgggatctcc acgcgaatct cgggtacgtg ttccggacat ggtctcttct 3900
 ccggtagcgg cggagcttct acatccgagc cctgctccca tgcctccagc gactcatggt 3960
 cgctcggcag ctcttgctc ctaacagtgg aggccagact taggcacagc acgatgccca 4020
 ccaccaccag tgtgccgcac aaggccgtgg cggtagggta tgtgtctgaa aatgagctcg 4080
 gggagcgggc ttgaccgct gacgcatttg gaagacttaa ggcagcggca gaagaagatg 4140
 caggcagctg agttgttggt ttctgataag agtcagaggt aactcccgtt gcgggtgctgt 4200
 taacggtgga gggcagtgta gtctgagcag tactcgttgc tgccgcgcgc gccaccagac 4260
 ataatagctg acagactaac agactgttcc tttccatggg tcttttctgc agtcaccgtc 4320
 cttgacacga agcttatact cgagctctag attgggaacc cgggtctctc gaattcgaga 4380
 tctccaccat gcacagacct agacgtcgtg gaactcgtcc acctccactg gcaactgctcg 4440
 ctgctctcct cctggctgca cgtggtgctg atgcagaggt gcagctggtg gactctgggg 4500
 gagccatagt aaagccgggg gggcccata gactctcctg tgaagcctct ggattcactt 4560
 tcagtaacgc ctggatgagt tgggtccgcc aggctccagg gagggggctg gactgggttg 4620
 gccgtatattt aagcaagact gatggtggga cgacagacta cgctgcaccc gtgaaagaca 4680
 gattcaccat ttcaagagat gattctaaaa atatgttggt tctgcaaag gacagcctga 4740
 aaatcgagga cacagccgtg tatttctgta ccacggccga tttttggagt gcttattctt 4800
 ctgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctctc aggaggtgga ggttccgggg 4860
 gcgggggctc cggcggagggt ggatcagata ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc 4920
 ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtcagagc ctctgcata 4980
 gtaatgggta caactatttg gattggtacc tacagaagcc agggcagtct ccacaactcc 5040
 tgatctattt gggttctaata cgggcctccg gggtcctga caggttcagt ggcagtgat 5100
 caggcacaga ttttactctg aaaatcagca gaatggaggc tgaggatggt ggggtttatt 5160
 actgcatgca aggtctacaa actccgtaca cttttggcca ggggaccaag ctggagatca 5220
 aaggaggcgg agggagtgtt ttgttttata tggccgttgg gataatgttt ctcgtaaata 5280

ES 2 805 526 T3

cagtactttg ggtaacaata aggaaggaac tgaagagaaa gaaaaaatgg gatctggaaa 5340
 tatcattgga cagtggacac gaaaaaaaaag tcacatcatc attgcaagaa gaccggcact 5400
 tggaggagga actgaaatgt caagagcaaa aagaagaaca actgcaagaa ggcgtacata 5460
 gaaaagaacc acagggagca acataggcgg cgcctaata gccataccac atttgtagag 5520
 gtttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat 5580
 gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc 5640
 atcaciaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgag tttgtccaaa 5700
 ctcatcaatg tatcttatca tgtctaccgg tataacttcg tataatgtat actatacgaa 5760
 gttag 5765

5 <210> 49
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético

<400> 49

gacatcgtga tgaccagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg ggtacaacta tttggattgg 120
 tacctacaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagaatgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggtct acaaactccg 300
 tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgag ctgatgctgc accaactgta 360
 tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420
 ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 480
 caaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540
 agcagcacc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600
 gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

15 <210> 50
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintético

<400> 50

ES 2 805 526 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagcc atagtaaagc cggggggggtc ccatagagtc 60
 tcctgtgaag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagttgggt ccgccaggct 120

 ccagggaggg ggctggagtg ggttggccgt attttaagca agactgatgg tgggacgaca 180
 gactacgctg caccctgtaa agacagattc accatttcaa gagatgattc taaaaatatg 240
 ttgtttctgc aaatggacag cctgaaaatc gaggacacag ccgtgtattt ctgtaccacg 300
 gccgattttt ggagtgctta ttcttctgac tactggggcc agggaacctt ggtcacctgc 360
 tcctcagcca aaacaacagc cccatcggtc tatccactgg ccctgtgtg tggagataca 420
 actggctcct cggtgactct aggatgcctg gtcaagggtt atttccctga gccagtgacc 480
 ttgacctgga actctggatc cctgtccagt ggtgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag 540
 tctgacctct acaccctcag cagctcagtg actgtaacct cgagcacctg gccagccag 600
 tccatcacct gcaatgtggc ccaccggca agcagcacca aggtggaca gaaaattgag 660
 ccagagggc ccacaatcaa gccctgtcct ccatgcaaat gccagcacc taacctcttg 720
 ggtggaccat ccgtcttcat cttccctcca aagatcaagg atgtactcat gatctccctg 780
 agcccatag tcacatgtgt ggtggtggat gtgagcagag atgaccaga tgtccagatc 840
 agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac acagctcaga cacaaccca tagagaggat 900
 tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt 960
 ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac aaagacctcc cagcgcccat cgagagaacc 1020
 atctcaaaac ccaaagggtc agtaagagct ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagaa 1080
 gaagagatga ctaagaaaca ggtcactctg acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa 1140
 gacatttacg tggagtggac caacaacggg aaaacagagc taaactaaa gaactactgaa 1200
 ccagtctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag 1260
 aactgggtgg aaagaaatag ctactcctgt tcagtgggtcc acgagggtct gcacaatcac 1320
 cacacgacta agagcttctc ccggactccg ggtaaatga 1359

<210> 51
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 51

5

10

ES 2 805 526 T3

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggagcc	atagtaaagc	cgggggggctc	ccatagagtc	60
tcctgtgaag	cctctggatt	cactttcagt	aacgcctgga	tgagttgggt	ccgccaggct	120
ccagggaggg	ggctggagtg	ggttggccgt	attttaagca	agactgatgg	tgggacgaca	180
gactacgctg	cacccgtgaa	agacagattc	accatttcaa	gagatgattc	taaaaatatg	240
ttgtttctgc	aatggacag	cctgaaaatc	gaggacacag	ccgtgtatth	ctgtaccacg	300
gccgattttt	ggagtgctta	ttcttctgac	tactggggcc	aggaaccct	ggtcacgctc	360
tcctcaggag	gtggaggttc	cgggggcggg	ggctccggcg	gaggtggatc	agatattgtg	420
atgactcagt	ctccactctc	cctgcccgtc	accctggag	agccggcctc	catctcctgc	480
aggtctagtc	agagcctcct	gcatagtaat	gggtacaact	atttggattg	gtacctacag	540
aagccagggc	agtctccaca	actcctgatc	tatttggggt	ctaatacggc	ctccggggctc	600
cctgacaggt	tcagtggcag	tggatcaggc	acagatttta	cactgaaaat	cagcagaatg	660
gaggctgagg	atgttggggt	ttattactgc	atgcaaggtc	tacaaactcc	gtacactttt	720
ggccagggga	ccaagctgga	gatcaaagga	ggcggaggga	gtgttttgtt	ttatctggcc	780
gttgggataa	tgtttctcgt	aaatacagta	ctttgggtaa	caataaggaa	ggaactgaag	840
agaaagaaaa	aatgggatct	ggaaatatca	ttggacagtg	gacacgaaaa	aaaagtcaca	900
tcatcattgc	aagaagaccg	gcacttggag	gaggaactga	aatgtcaaga	gcaaaaagaa	960
gaacaactgc	aagaaggcgt	acatagaaaa	gaaccacagg	gagcaacata	g	1011

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y aislar células que producen altos niveles de una proteína heterodimérica que tiene una primera subunidad y una segunda subunidad, comprendiendo el método:

- 5 (a) transfectar células con un ácido nucleico que codifica una proteína de captura de la superficie celular (CSCP), que es una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a antígeno y un dominio de anclaje a la membrana, en donde la célula expresa la proteína heterodimérica, en donde la proteína heterodimérica comprende múltiples subunidades y un primer sitio en la proteína heterodimérica reside en una primera subunidad que
10 comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre que tiene un resto de histidina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un segundo sitio en la proteína heterodimérica se encuentra en una segunda subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones
15 IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT, en donde la CSCP comprende un scFv capaz de unirse a la primera subunidad pero no a la segunda subunidad de la proteína heterodimérica y en donde (i) la CSCP se une al primer sitio en la proteína heterodimérica para formar un complejo de CSCP-proteína heterodimérica dentro de la célula hospedadora, (ii) el complejo de CSCP-proteína heterodimérica se transporta a través de la célula hospedadora y (iii) después se presenta sobre la superficie de la célula hospedadora;
- (b) detectar una célula de (a) que expresa la CSCP con alto rendimiento;
- (c) aislar y cultivar la célula que expresa la CSCP con alto rendimiento;
- (d) detectar la proteína heterodimérica en la superficie de la célula aislada y cultivada de la etapa (c) con una molécula de detección que se une al segundo sitio en la proteína heterodimérica, en donde la molécula de
25 detección comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT; y
- (e) aislar la célula detectada en la etapa (d) que porta la proteína heterodimérica detectada en su superficie.

2. Un método para detectar o aislar una célula que expresa de manera estable una proteína heterodimérica que tiene una primera subunidad y una segunda subunidad, comprendiendo el método las etapas de:

(a) expresar en una célula hospedadora:

- 35 (i) una proteína de captura de la superficie celular (CSCP) que comprende una proteína de unión a antígeno y un dominio de anclaje a la membrana y
- (ii) una proteína heterodimérica, en donde la proteína heterodimérica comprende múltiples subunidades y un primer sitio en la proteína heterodimérica reside en una primera subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre que tiene un resto de histidina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de tirosina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un segundo sitio en la proteína heterodimérica se encuentra en una
40 segunda subunidad que comprende una cadena pesada que comprende un dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT, en donde la CSCP comprende un scFv capaz de unirse a la primera subunidad pero no a la segunda subunidad de la proteína heterodimérica; y,
- en donde (i) la CSCP se une al primer sitio en la proteína heterodimérica para formar un complejo de CSCP-proteína heterodimérica dentro de la célula hospedadora, (ii) el complejo de CSCP-proteína heterodimérica se transporta a través de la célula hospedadora y (iii) después se presenta sobre la superficie de la célula
50 hospedadora;
- (b) poner en contacto la célula hospedadora con una molécula de detección, en donde la molécula de detección se une al segundo sitio en la proteína heterodimérica, en donde la molécula de detección comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une específicamente al dominio CH3 sustituido que tiene un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT; y
- (c) seleccionar la célula hospedadora que se une a la molécula de detección.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína heterodimérica comprende un anticuerpo biespecífico, una proteína de fusión que contiene Fc o un TCR-Fc.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la CSCP comprende una proteína de unión a antígeno recombinante que se une a un dominio Fc de IgG1 humana, un dominio Fc de IgG2 humana o un dominio Fc de IgG4 humana.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el método comprende poner en contacto la

célula con una molécula de bloqueo, en donde la molécula de bloqueo se une a la CSCP que no está unida a la proteína heterodimérica, pero no se une al complejo de CSCP-proteína heterodimérica.

5 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula se detecta y selecciona mediante clasificación celular activada por fluorescencia.

10 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de detección (DM) comprende una proteína de unión a antígeno recombinante marcada que se une a un dominio Fc de IgG1 humana, un dominio Fc de IgG2 humana o un dominio Fc de IgG4 humana, en donde el dominio Fc comprende un resto de arginina en la posición 95 de acuerdo con el sistema de numeración de exones de IMGT y un resto de fenilalanina en la posición 96 de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde:

15 (a) la proteína de unión a antígeno comprende un anticuerpo o un scFv que se une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42;

(b) la proteína de unión a antígeno comprende un anticuerpo o scFv que se une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 con una K_d de menos de aproximadamente 60 nM medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; o

20 (c) la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo o scFv que se une al mismo epítipo en el polipéptido de CH3 sustituido que un anticuerpo que comprende una CDR-1 de cadena pesada (HCDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, una HCDR-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una HCDR-3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una CDR-1 de cadena ligera (LCDR-1) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, una LCDR-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una LCDR-3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

9. El método de la reivindicación 8, en donde:

30 (a) la proteína de unión a antígeno de la molécula de detección comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 38 o de una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 39;

35 (b) la proteína de unión a antígeno de la molécula de detección comprende una CDR-1 de cadena pesada (HCDR-1) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, una HCDR-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, una HCDR-3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, una CDR-1 de cadena ligera (LCDR-1) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, una LCDR-2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una LCDR-3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

40 (c) la proteína de unión a antígeno de la molécula de detección comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 38 y una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 39; o

(d) la proteína de unión a antígeno de la molécula de detección comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 y una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39;

45 (e) la proteína de unión a antígeno de la molécula de detección es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 40 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 41; o

50 (f) la proteína de unión a antígeno recombinante de la molécula de detección es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 40 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 41.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína de unión a antígeno de la molécula de detección es una proteína de fusión de scFv que comprende:

55 (a) (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 38; (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 39 y (iii) un dominio de anclaje de membrana;

(b) un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 38 y un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 39; o

(c) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.