

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 075**

51 Int. Cl.:

A61K 38/05 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2012 PCT/US2012/059477**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055745**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 12840074 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2771022**

54 Título: **Matrices de soporte derivadas de Tn3 específicas para CD40L y sus métodos de empleo**

30 Prioridad:

11.10.2011 US 201161546028 P

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

14.04.2021

73 Titular/es:

**VIELA BIO, INC. (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**COYLE, ANTHONY;
BACA, MANUEL;
THISTED, THOMAS;
DRABIC, STACEY;
GRINBERG, LUBA;
NOVARRA, SHABAZZ;
OGANESYAN, VAHEH;
HERBST, RONALD y
SPENCER, DAVID, KENNETH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 819 075 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

Matrices de soporte derivadas de Tn3 específicas para CD40L y sus métodos de empleo

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de los miméticos de anticuerpos, específicamente a matrices de soporte derivadas del tercer dominio de fibronectina de tipo III de la tenascina C humana útiles, por ejemplo, para generar productos con características de unión novedosas. En particular, la invención se refiere a matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L, métodos para preparar tales matrices de soporte, y sus métodos de empleo para el diagnóstico y tratamiento del lupus eritematoso sistémico y trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios.

10 Técnica anterior

Esta invención se refiere a matrices de soporte proteicas específicas para CD40L que se unen a CD40L útiles, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios.

15 Las biomoléculas capaces de unirse específicamente a un epítipo diana deseado son muy importantes como herramientas terapéuticas, de investigación y de diagnóstico médico. Un ejemplo muy conocido de esta clase de moléculas es el anticuerpo. Se pueden seleccionar anticuerpos que se unen específicamente y que tengan afinidad por prácticamente cualquier epítipo estructural. Sin embargo, los anticuerpos clásicos son moléculas heterotetraméricas estructuralmente complejas que son difíciles de expresar en sistemas eucariotas simples. Como consecuencia, la mayoría de los anticuerpos se producen utilizando sistemas de expresión celular de mamíferos costosos y complejos.

20 Se pueden utilizar proteínas con estructuras tridimensionales relativamente definidas, denominadas habitualmente matrices de soporte proteicas, como reactivos para el diseño de productos modificados. Un área particular en la que este tipo de matrices de soporte son útiles es el campo del diseño de miméticos de anticuerpos. Los miméticos de anticuerpos, es decir, agentes terapéuticos proteicos pequeños que no son anticuerpos, aprovechan las ventajas de los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos, tales como una afinidad de unión a las dianas alta y una inmunogenia y una toxicidad baja, mientras que evitan algunos de los inconvenientes, tales como la tendencia de los fragmentos de anticuerpos a agregarse y a ser menos estables que las IgG completas.

25 Se puede hacer frente a estos inconvenientes utilizando fragmentos de anticuerpos creados mediante la eliminación de partes del plegamiento original de los anticuerpos. Sin embargo, esto suele provocar su agregación cuando los residuos aminoacídicos, que normalmente estarían internalizados en el entorno hidrofóbico tal como una interfaz entre un dominio variable y constante, se ven expuestos al disolvente. Un ejemplo de un mimético de anticuerpo basado en una matriz de soporte se basa en la estructura de un dominio de fibronectina de tipo III (FnIII), un dominio presente en numerosos fillos y clases de proteínas tales como en proteínas estructurales y sanguíneas de mamíferos. El diseño y el uso de matrices de soporte de FnIII derivadas del tercer dominio FnIII de la tenascina C humana se describen en las solicitudes de PCT PCT/US2011/032184 y PCT/US2011/032188.

30 El CD40L es un miembro de la familia de moléculas TNF que se expresa principalmente en linfocitos T activados (incluidos los subtipos Th0, Th1 y Th2) y forma homotrimeros al igual que otros miembros de esta familia. Además, también se ha descubierto que el CD40L se expresa en mastocitos, y basófilos y eosinófilos activados. El CD40L se une al receptor CD40 (CD40R) en células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), lo cual produce muchos efectos dependiendo del tipo de célula diana. En general, el CD40L desempeña la función de una molécula coestimuladora e induce la activación en APC en relación con la estimulación de los receptores de los linfocitos T por parte de las moléculas MHC sobre las APC.

35 La señalización a través del receptor CD40 por parte de CD40L inicia la cascada de eventos que provocan la activación de las células portadoras del receptor CD40 y la sensibilización óptima de los linfocitos T CD4+. Más específicamente, la interacción cognada entre CD40L y el receptor CD40 fomenta la diferenciación de los linfocitos B en células secretoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria (Burkly, en *Adv. Exp. Med. Bio.*, Vol. 489., D. M. Monroe, U. Hedner, M. R. Hoffman, C. Negrier, G. F. Savidge y G. C. I. White, eds. Klower Academic/Plenum Publishers, 2001, p. 135). Además, la interacción entre CD40L y el receptor CD40 fomenta la inmunidad mediada por células mediante la activación de macrófagos y células dendríticas, y la generación de linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T citotóxicos (remítase a Burkly, *supra*).

40 Se ha demostrado que la interacción entre CD40L y el receptor CD40 es importante en varias enfermedades autoinmunitarias inducidas experimentalmente tales como la artritis inducida por colágeno, encefalomielitis alérgica experimental, ooforitis, colitis y nefritis lúpica inducida por fármacos. Específicamente, se ha demostrado que la inducción de enfermedades en todos estos modelos se puede bloquear con antagonistas de CD40L en el momento en el que se administre el antígeno. El bloqueo de enfermedades utilizando antagonistas anti-CD40L también se ha

observado en modelos de enfermedades autoinmunitarias espontáneas en animales, incluidas la diabetes insulino dependiente y la nefritis lúpica, así como también modelos patológicos de la enfermedad del injerto contra el huésped, un trasplante, la fibrosis pulmonar y la aterosclerosis.

5 La disrupción de la vía CD40L/CD40R mediante el bloqueo de CD40L se ha demostrado que es beneficiosa en muchas enfermedades mediadas por el sistema inmunitario (por ejemplo, pero sin carácter limitante, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y rechazo de aloinjerto). Por ejemplo, el tratamiento con anticuerpos anti-CD40L previno o mejoró la nefritis en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratones (Mohan *et al. J. Immuno.* 154:1470). Además, los anticuerpos anti-CD40L preservaron la función renal en ratones SNF1 con nefritis estabilizada. (Kalled *et al. J. Immuno.* 160:2158). Los niveles de CD40L tienen una correlación estrecha con la gravedad de la patología clínica (es decir, la reducción de la inflamación) y el daño en el tejido diana, tanto en los seres humanos como no humanos.

10 El LES es una enfermedad autoinmunitaria progresiva y en algunos casos mortal. Las diversas presentaciones del lupus varían entre un sarpullido y artritis, pasando por anemia y trombocitopenia, hasta incluso psicosis. Existen pruebas evidentes que demuestran que muchos mecanismos de defensa del sistema inmunitario participan en el proceso inflamatorio que provoca enfermedades renales, cutáneas, cerebrales y trombosis. Un rasgo característico del LES es la pérdida de tolerancia a los linfocitos B y los autoanticuerpos prevalecen en pacientes con esta enfermedad. En la nefropatía lúpica, los autoanticuerpos anti-ADN bicatenario pueden formar complejos de anticuerpo-nucleosoma y depositarse en la membrana basal glomerular renal. Estos inmunocomplejos activan a su vez el complemento, lo cual puede provocar glomerulonefritis.

15 En los pacientes con LES se han detectado niveles elevados de expresión de CD40R así como también de CD40L. El incremento de la señal coestimuladora probablemente contribuye a la respuesta inflamatoria patológica observada en el LES. Los linfocitos T de LES han incrementado de forma espontánea la activación asociada con un umbral reducido de activación para autoantígenos. Además, estas células son hiposensibles a otra estimulación antigénica, son resistentes a la apoptosis, tienen una mayor tasa de supervivencia después de la activación y tienen muchas vías de señalización intracelular alteradas. Tras la activación de CD40R en las APC por parte del CD40L de los linfocitos T, tanto las APC como los linfocitos T se activan, producen citocinas y en el LES contribuyen a la producción de autoanticuerpos patogénicos y lesiones tisulares (nefritis lúpica). El bloqueo de la vía CD40R/CD40L es eficaz, solo o combinado, para bloquear la enfermedad en ratones predisuestos a desarrollar lupus. En pacientes con LES, un anticuerpo anti-CD40L humanizado redujo los anti-ADNbc y los linfocitos B, la proteinuria y redujo la gravedad de la enfermedad en el LES.

20 Law et al., Therapeutic Targets of the TNF superfamily, Landes Bioscience y Springer Science + Business Media (2009), vol. 647, p. 8-36 describe intervenciones terapéuticas dirigidas contra CD40L (CD154) y CD40.

25 Sin embargo, el bloqueo de CD40L con anticuerpos tradicionales ha suscitado considerables preocupaciones concernientes a su seguridad. Por ejemplo, un estudio con anticuerpos anti-CD40L 5c8 (BIOGEN®) en pacientes que padecían púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) refractaria se suspendió debido a que se reportaron complicaciones tromboembólicas (Davidson *et al. Arth Rheu.* 43:S271). Además, otros ensayos con anticuerpos alternativos dirigidos contra CD40L originaron otras complicaciones tromboembólicas relacionadas (Davis *et al. Arth Rheu.* 43:S281; Schuler, *Transplantation*, 77:717). Teniendo en cuenta las complicaciones del antagonismo con anticuerpos dirigidos de CD40L, se sigue necesitando un modo de bloquear y antagonizar CD40L con una alternativa que no sea un anticuerpo. Por lo tanto, el bloqueo de CD40L con una matriz de soporte basada en Tn3 es una alternativa atractiva para evitar la agregación plaquetaria mediada por Fab2 y/o Fc y sus efectos secundarios posteriores.

30 La mención o discusión de una referencia en la presente no se debe interpretar como una admisión de que esta sea una técnica anterior a la presente invención.

COMPENDIO DE LA INVENCION

35 La invención proporciona una matriz de soporte de Tn3 que comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la subunidad monomérica comprende siete hebras beta denominadas A, B, C, D, E, F y G, y seis regiones de bucles denominadas AB, BC, CD, DE, EF y FG, y donde la matriz de soporte de Tn3 se une específicamente a CD40L. En algunos aspectos, la matriz de soporte de Tn3 comprende una única subunidad monomérica específica para CD40L. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende dos subunidades monoméricas específicas para CD40L conectadas en tándem. En algunas realizaciones específicas, la matriz de soporte de Tn3 comprende dos subunidades monoméricas específicas para CD40L que están conectadas directamente.

40 En algunas realizaciones, dos subunidades monoméricas específicas para CD40L están conectadas por medio de un conector. En otras realizaciones, el conector comprende un conector peptídico, que puede ser un conector peptídico flexible. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia $(G_mX)_n$ donde X es serina (S), alanina (A), glicina (G), leucina (L), isoleucina (I) o valina (V); m y n tienen valores de números enteros; m es 1, 2, 3 o

4; y, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende la SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143.

5 En algunas realizaciones, la unión de una matriz de soporte de Tn3 que comprende dos subunidades monoméricas específicas para CD40L con CD40L es mejor que la de una matriz de soporte de Tn3 que comprende una única subunidad monomérica específica para CD40L. En otras realizaciones, la unión de una matriz de soporte de Tn3 que comprende dos subunidades monoméricas específicas para CD40L con CD40L mejora la acción sobre la diana en comparación con la de una matriz de soporte de Tn3 que comprende una única subunidad monomérica específica para CD40L. En otras realizaciones, la mejora en la unión de la matriz de soporte de Tn3 con CD40L es una mejora en la afinidad de unión, una mejora en la avidéz de unión o ambas. En ciertas realizaciones, la afinidad de unión de una matriz de soporte de Tn3 que comprende dos subunidades monoméricas específicas para CD40L con CD40L y la estabilidad proteica de la matriz de soporte de Tn3 son mejores que las de una matriz de soporte de Tn3 que comprende una única subunidad monomérica específica para CD40L. En algunas realizaciones, la avidéz de unión de una matriz de soporte de Tn3 que comprende dos subunidades monoméricas específicas para CD40L por CD40L y la estabilidad proteica de la matriz de soporte de Tn3 son mejores que las de una matriz de soporte de Tn3 que comprende una única subunidad monomérica específica para CD40L.

10 En algunas realizaciones, al menos una subunidad monomérica específica para CD40L en una matriz de soporte de Tn3 está unida a un conector o a un resto heterólogo. En otras realizaciones, un conector o un resto heterólogo en una matriz de soporte de Tn3 está conjugado con el extremo N o el extremo C de una subunidad monomérica específica para CD40L. En ciertas realizaciones, el conector unido a una subunidad monomérica específica para CD40L en una matriz de soporte de Tn3 comprende un conector peptídico, que en algunas realizaciones puede ser un conector peptídico flexible. El conector peptídico puede comprender, en ciertas realizaciones, una secuencia $(G_mX)_n$ donde X es serina (S), alanina (A), glicina (G), leucina (L), isoleucina (I) o valina (V); m y n son números enteros; m es 1, 2, 3 o 4; y, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. En algunas realizaciones, el conector peptídico unido a una subunidad monomérica específica para CD40L en una matriz de soporte de Tn3 comprende la SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143.

20 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende un conector que comprende un resto funcional. En algunas realizaciones, este resto funcional es una inmunoglobulina o uno de sus fragmentos. En ciertas realizaciones, esta inmunoglobulina o su fragmento comprende un dominio Fc. En algunas realizaciones, este dominio Fc no consigue inducir al menos una función efectora mediada por FcγR. En algunas realizaciones, esta función efectora mediada por FcγR es ADCC.

30 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende al menos una subunidad monomérica específica para CD40L unida a un resto heterólogo. En algunas realizaciones, este resto heterólogo comprende una composición seleccionada entre el grupo constituido por: una proteína, un péptido, un dominio proteico, un conector, un fármaco, una toxina, un agente citotóxico, un contraste, un radionucleido, un compuesto radioactivo, un polímero orgánico, un polímero inorgánico, un polietilenglicol (PEG), biotina, una albúmina, una albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés), una porción de unión a FcRn de HSA, un anticuerpo, un dominio de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de un dominio, un dominio de unión a albúmina, una enzima, un ligando, un receptor, un péptido de unión, una matriz de soporte que no sea de FnIII, un epítipo marcador, un polímero polipeptídico recombinante, una citocina y una combinación de dos o más de estos restos.

40 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende al menos una subunidad monomérica específica para CD40L conjugada con PEG. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende al menos una subunidad monomérica específica para CD40L conjugada con una albúmina. En ciertas realizaciones, esta albúmina es albúmina sérica humana (HSA). En otras realizaciones, esta HSA es una variante de HSA. En otras realizaciones específicas, la secuencia de aminoácidos de la variante de HSA es la SEQ ID NO: 133. En otras realizaciones, la variante de HSA tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con una HSA nativa o un fragmento de una HSA nativa. En ciertas realizaciones, la propiedad mejorada es una semivida plasmática alterada en comparación con la semivida plasmática de una HSA nativa o un fragmento de una HSA nativa. En algunas realizaciones, la semivida plasmática alterada es una semivida plasmática más prolongada en comparación con la semivida plasmática de una HSA nativa o un fragmento de una HSA nativa. En otras realizaciones, la semivida plasmática alterada es una semivida plasmática más corta en comparación con la semivida plasmática de una HSA nativa o un fragmento de una HSA nativa.

55 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 se fusiona con una variante de HSA que comprende al menos una sustitución aminoacídica en el dominio III de la HSA. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 se fusiona con una variante de HSA que comprende la secuencia de la HSA madura completa (SEQ ID NO: 133 o 138) o un fragmento de esta, salvo por al menos una sustitución aminoacídica, numerada respecto a la posición en la HSA madura completa, en una posición seleccionada entre el grupo constituido por 407, 415, 463, 500, 506, 508, 509, 511, 512, 515, 516, 521, 523, 524, 526, 535, 550, 557, 573, 574 y 580; donde la sustitución aminoacídica no comprende sustituir una lisina (K) por ácido glutámico (E) en la posición 573, y donde la matriz de soporte de Tn3 tiene una

semivida plasmática más prolongada que la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 que no está conjugada con dicha variante de HSA.

5 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 se fusiona con una variante de HSA, donde al menos una sustitución aminoacídica, numerada respecto a la posición en la HSA madura completa, se encuentra en una posición
 10 seleccionada entre el grupo constituido por 463, 508, 523 y 524, donde dicha matriz de soporte de Tn3 tiene una semivida plasmática más prolongada que la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 que no está conjugada con dicha variante de HSA. En algunas realizaciones, la variante de HSA comprende la secuencia de la HSA madura completa (SEQ ID NO: 133 o 138) o un fragmento de esta, salvo por al menos una sustitución aminoacídica, numerada respecto a la posición en la HSA madura completa, seleccionada entre el grupo constituido por: (a) sustitución de leucina (L) en la posición 407 por asparagina (N) o tirosina (Y); (b) sustitución de valina (V) en la posición 415 por treonina (T); (c) sustitución de leucina (L) en la posición 463 por asparagina (N); (d) sustitución de lisina (K) en la posición 500 por arginina (R); (e) sustitución de treonina (T) en la posición 506 por tirosina (Y); (f) sustitución de treonina (T) en la posición 508 por arginina (R); (g) sustitución de fenilalanina (F) en la posición 509 por metionina (M) o triptófano (W); (h) sustitución de alanina (A) en la posición 511 por fenilalanina (F); (i) sustitución de ácido aspártico (D) en la posición 512 por tirosina (Y); (j) sustitución de treonina (T) en la posición 515 por glutamina (Q); (k) sustitución de leucina (L) en la posición 516 por treonina (T) o triptófano (W); (l) sustitución de arginina (R) en la posición 521 por triptófano (W); (m) sustitución de isoleucina (I) en la posición 523 por ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), lisina (K) o arginina (R); (n) sustitución de lisina (K) en la posición 524 por leucina (L); (o) sustitución de Glutamina (Q) en la posición 526 por metionina (M); (p) sustitución de histidina (H) en la posición 535 por prolina (P); (q) sustitución de ácido aspártico (D) en la posición 550 por ácido glutámico (E); (r) sustitución de lisina (K) en la posición 557 por glicina (G); (s) sustitución de lisina (K) en la posición 573 por fenilalanina (F), histidina (H), prolina (P), triptófano (W) o tirosina (Y); (t) sustitución de lisina (K) en la posición 574 por asparagina (N); (u) sustitución de glutamina (Q) en la posición 580 por lisina (K); y (v) una combinación de dos o más de estas sustituciones, donde dicha matriz de soporte de Tn3 tiene una semivida plasmática más prolongada que la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 que no está conjugada con dicha variante de HSA.

15 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 se fusiona con una variante de HSA que comprende la secuencia de la HSA madura completa (SEQ ID NO: 133 o 138) o un fragmento de esta, salvo por al menos una sustitución aminoacídica, numerada respecto a la posición en la HSA madura completa, seleccionada entre el grupo constituido por: (a) sustitución de leucina (L) en la posición 463 por asparagina (N); (b) sustitución de treonina (T) en la posición
 20 508 por arginina (R); (c) sustitución de isoleucina (I) en la posición 523 por ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), lisina (K) o arginina (R); (d) sustitución de lisina (K) en la posición 524 por leucina (L); y (e) una combinación de dos o más de estas sustituciones, donde dicha matriz de soporte de Tn3 tiene una semivida plasmática más prolongada que la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 que no está conjugada con dicha variante HSA.

25 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L idénticas. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L diferentes. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 es un agonista del receptor CD40. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 es un antagonista del receptor CD40.

30 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L que están unidas específicamente al mismo epítipo de CD40L. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L que están unidas específicamente a epítopos diferentes de CD40L. En algunas realizaciones, estos epítopos de CD40L diferentes son epítopos no superpuestos. En otras realizaciones, estos epítopos de CD40L diferentes son epítopos superpuestos.

35 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 se une al menos a dos moléculas de CD40L. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que se une a al menos dos moléculas de CD40L.

40 En algunas realizaciones, las hebras beta de al menos una subunidad monomérica específica para CD40L de la matriz de soporte de Tn3 tienen al menos un 90% de identidad secuencial respecto a las hebras beta de la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una hebra beta A que comprende la SEQ ID NO: 11, o que comprende una hebra beta A que comprende la SEQ ID NO: 11, salvo por al menos una mutación. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una hebra beta B que comprende la SEQ ID NO: 12, o que comprende una hebra beta B que comprende la SEQ ID NO: 12, salvo por al menos una mutación. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una hebra beta C que comprende la SEQ ID NO: 13 o 14, o que comprende una hebra beta C que comprende la SEQ ID NO: 13 o 14, salvo por al menos una mutación, y donde la cisteína en la SEQ ID NO: 13 o 14 no está sustituida. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una hebra beta D que comprende la SEQ ID NO: 15, o que comprende una hebra beta D que comprende la SEQ ID NO: 15, salvo por al menos una mutación.

5 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una hebra beta E que comprende la SEQ ID NO: 16, o que comprende una hebra beta E que comprende la SEQ ID NO: 16, salvo por al menos una mutación. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una hebra beta F que comprende la SEQ ID NO: 17, o que comprende una hebra beta F que comprende la SEQ ID NO: 17, salvo por al menos una mutación, y donde la cisteína en la SEQ ID NO: 17 no está sustituida. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una hebra beta G que comprende la SEQ ID NO: 18, o que comprende una hebra beta G que comprende la SEQ ID NO: 18, salvo por al menos una mutación.

10 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende la secuencia de aminoácidos:

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT

15 donde: X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} y X_{FG} representan los residuos aminoacídicos presentes en las secuencias de los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente; X₁ representa el residuo aminoacídico A o T; y la longitud del bucle *n* es un número entero comprendido entre 2 y 26.

20 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle AB comprende la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle CD comprende la SEQ ID NO: 6 y la secuencia del bucle EF comprende la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 137. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 y 168. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle DE comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 94, 95, 96, 97, 98 y 169. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle FG comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 9, 99, 139 y 170.

25 En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 y 174. En ciertas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle DE comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 y 175. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle FG comprende una secuencia seleccionada entre los grupos constituidos por las SEQ ID NOs: 129, 130 y 177. En ciertas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle AB comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 4 y 136.

30 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 83, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 83, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 99. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 84, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 95 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139.

35 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 85, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 86, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 96 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 87, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 97 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139.

40 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 88, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 95 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 89, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica

Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 115, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 126 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 129. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 116, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 127 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 129. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 117, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 128 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 129. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde la secuencia del bucle AB comprende la SEQ ID NO: 136.

En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 146. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende la secuencia de aminoácidos:

IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGIKDVPGRDRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDTYEYVSLICRX₁₂GD
MSSNPAKETFTT (SEQ ID NO: 167)

donde: (a) X₁ representa un residuo aminoacídico de serina (S) o leucina (L); (b) X₂ representa un residuo aminoacídico de ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E); (c) X₃ representa un residuo aminoacídico de histidina (H), isoleucina (I), valina (V), fenilalanina (F) o triptófano (W); (d) X₄ representa un residuo aminoacídico de alanina (A), glicina (G), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); (e) X₅ representa un residuo aminoacídico de ácido glutámico (E), leucina (L), glutamina (Q), serina (S), ácido aspártico (D) o asparagina (N); (f) X₆ representa un residuo aminoacídico de fenilalanina (F) o tirosina (Y); (g) X₇ representa un residuo aminoacídico de isoleucina (I), valina (V), histidina (H), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); (h) X₈ representa un residuo aminoacídico de glicina (G), triptófano (W) o valina (V); (i) X₉ representa un residuo aminoacídico de triptófano (W), fenilalanina (F) o tirosina (Y); (j) X₁₀ representa un residuo aminoacídico de (S), glutamina (Q), metionina (M) o histidina (H); (k) X₁₁ representa un residuo aminoacídico de triptófano (W) o histidina (H); y (l) X₁₂ representa un residuo aminoacídico de arginina (R) o serina (S).

En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 y 82.

En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que comprende la secuencia de aminoácidos:

IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVS
LICTTDGTYX₁₇NPAKETFTT (SEQ ID NO: 171)

donde:

- (a) X₁ representa un residuo aminoacídico de lisina (K) o ácido glutámico (E);
- (b) X₂ representa un residuo aminoacídico de treonina (T) o isoleucina (I);
- (c) X₃ representa un residuo aminoacídico de asparagina (N) o alanina (A);
- (d) X₄ representa un residuo aminoacídico de serina (S), leucina (L), alanina (A), fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- (e) X₅ representa un residuo aminoacídico de tirosina (Y), alanina (A), glicina (G), valina (V), isoleucina (I) o serina (S);
- (f) X₆ representa un residuo aminoacídico de tirosina (Y), serina (S), alanina (A) o histidina (H);
- (g) X₇ representa un residuo aminoacídico de asparagina (N), ácido aspártico (D), histidina (H) o tirosina (Y);
- (h) X₈ representa un residuo aminoacídico de leucina (L), fenilalanina (F), histidina (H) o tirosina (Y);
- (i) X₉ representa un residuo aminoacídico de histidina (H), prolina (P), serina (S), leucina (L) o ácido aspártico (D);
- (j) X₁₀ representa un residuo aminoacídico de glicina (G), fenilalanina (F), histidina (H) o tirosina (Y);
- (k) X₁₁ representa un residuo aminoacídico de alanina (A) o treonina (T);
- (l) X₁₂ representa un residuo aminoacídico de serina (S), asparagina (N), ácido glutámico (E), arginina (R) o ácido aspártico (D);
- (m) X₁₃ representa un residuo aminoacídico de serina (S), glutamina (Q), treonina (T), asparagina (N) o alanina (A);

- (n) X₁₄ representa un residuo aminoacídico de prolina (P), valina (V), isoleucina (I) o alanina (A) o ningún aminoácido;
- (o) X₁₅ representa un residuo aminoacídico de isoleucina (I) o ningún aminoácido;
- (p) X₁₆ representa un residuo aminoacídico de ácido glutámico (E) o lisina (K); y
- (q) X₁₇ representa un residuo aminoacídico de serina (S) o asparagina (N).

5 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 134, 135, 205, 206, 207 y 208. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NO: 134, 135, 205, 206, 207 y 208.

10 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 201, 202, 203 y 204. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 201, 202, 203 y 204. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde dicha especificidad por CD40L es hacia el CD40L humano. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L, donde dicha especificidad por CD40L es hacia el CD40L unido a la membrana (SEQ ID NO: 1), el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones específicas, la matriz de soporte de Tn3 se une a CD40L y previene la unión de CD40L a CD40.

15 La invención también proporciona un método para alterar una actividad en una célula que expresa CD40L, el cual comprende poner la célula en contacto con una matriz de soporte de Tn3, donde la matriz de soporte de Tn3 se une a CD40L y previene la unión de CD40L a CD40. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 se une a CD40L con una afinidad (K_d) aproximadamente menor o igual a 1 μM, o aproximadamente menor o igual a 500 nM, o aproximadamente menor o igual a 100 nM, o aproximadamente menor o igual a 50 nM, o aproximadamente menor o igual a 25 nM, o aproximadamente menor o igual a 10 nM, o aproximadamente menor o igual a 5 nM, o aproximadamente menor o igual a 2 nM.

20 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que se une específicamente a un epítipo de CD40L que comprende los aminoácidos situados en las posiciones 142-155, 200-230 o 247-251 de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que interacciona con los aminoácidos E142, Y146, M148, N151, L155, R200, R203 y E230 de CD40L. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que interacciona con los aminoácidos R203, I204, V247, H249 y T251 de CD40L. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que interacciona con los aminoácidos E142, Y146, M148, N151 y L155 de CD40L, que están situados en una primera molécula de CD40L, y con los aminoácidos R200, R203 y E230 de CD40L, que están situados en una segunda molécula de CD40L. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una subunidad monomérica específica para CD40L que interacciona con los aminoácidos R203 e I204 de CD40L, que están situados en una primera molécula de CD40L, y con los aminoácidos V247, H249 y T251 de CD40L, que están situados en una segunda molécula de CD40L.

25 La invención también proporciona polipéptidos que comprenden uno o más monómeros de Tn3 específicos para CD40L, que incluyen, sin carácter limitante, las fusiones de albúmina sérica que se describen en la presente.

30 La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L, un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L y una célula huésped que comprende dicho vector. La invención también proporciona un método para producir una matriz de soporte de Tn3 que comprende cultivar la célula huésped en condiciones en las que se exprese la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L codificada por la molécula de ácido nucleico.

35 La descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La descripción también proporciona un método para prevenir, tratar, mejorar o controlar una enfermedad autoinmunitaria en un paciente que lo necesite que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L.

40 La descripción también proporciona un método para reducir la frecuencia o la cantidad de corticosteroide administrado a un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L.

45 La enfermedad autoinmunitaria tratada mediante la administración de una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L puede ser alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, enfermedad

autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, síndrome de Sjogren, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y de otros tipos, fibroplasia retroental, degeneración macular asociada con la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluida la enfermedad de Grave), trasplante de cornea y de otros tejidos e inflamación crónica, sepsis, artritis reumatoide, peritonitis, enfermedad de Crohn, lesión por 5
reperfusión, septicemia, choque endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (p. ej., artritis psoriásica), choque anafiláctico, isquemia orgánica, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo de injerto, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis herpetiforme, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (SFCDI), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, 10
síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, síndrome de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, conectivitis mixta, esclerosis múltiple, diabetes mellitus mediada por el sistema inmunitario o de tipo 1, miastenia grave, pénfigo vulgar, 15
anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de Stiff- 20
man, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerativa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis de la dermatitis herpetiforme, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

En algunas realizaciones específicas, la enfermedad autoinmunitaria tratada mediante la administración de una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L es el lupus eritematoso sistémico (LES).

Los métodos de tratamiento con matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L pueden comprender además una terapia adicional tal como inmunoterapia, terapia biológica, quimioterapia, radioterapia o terapia con fármacos de 25
bajo peso molecular.

La descripción también proporciona un cristal proteico que comprende una matriz de soporte de Tn3 que consiste en la SEQ ID NO: 20 en un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) donde el cristal tiene una red cristalina en un grupo espacial ortorrómbico $P2_12_12_1$ y unas dimensiones de celda unidad, +/- 0.1%, de $a=85.69 \text{ \AA}$, $b=90.64 \text{ \AA}$ y $c=95.56 \text{ \AA}$. En algunos aspectos, la unidad asimétrica del cristal comprende un trímero de CD40L y tres moléculas de la matriz de soporte de Tn3. En otras realizaciones, los cristales difractan los rayos X para determinar las coordenadas 30
estructurales respecto a una resolución de un valor menor o igual a 3.2 \AA .

La descripción también proporciona un cristal proteico que comprende una matriz de soporte de Tn3 que consiste en la SEQ ID NO: 68 en un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) donde el cristal tiene una red cristalina en un grupo espacial cúbico $P2_13$ y unas dimensiones de celda unidad, +/- 0.1%, de $a=b=c=97.62 \text{ \AA}$. En algunos aspectos, 35
la unidad asimétrica del cristal comprende una molécula de CD40L y una molécula de la matriz de soporte de Tn3. En otros aspectos, el cristal difracta los rayos X para determinar las coordenadas estructurales respecto a una resolución de un valor menor o igual a 2.7 \AA .

La descripción también proporciona un cristal proteico que comprende una matriz de soporte de Tn3 que consiste en la SEQ ID NO: 28 o 146 en un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) donde el cristal tiene una red cristalina en un grupo espacial $P321$ y unas dimensiones de celda unidad, +/- 0.1%, de $a=95.53 \text{ \AA}$, $b=93.53 \text{ \AA}$ y $c=66.69 \text{ \AA}$. En algunos aspectos, la unidad asimétrica del cristal comprende una molécula de CD40L y una molécula de la matriz de soporte de Tn3. En otros aspectos, el cristal difracta los rayos X para determinar las coordenadas estructurales respecto a una resolución de un valor menor o igual a 2.8 \AA . 40

La descripción también proporciona un cristal proteico que comprende dos matrices de soporte de Tn3 diferentes que consisten en la SEQ ID NO: 68 y la SEQ ID NO: 28 o 146 en un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) donde el cristal tiene una red cristalina en un grupo espacial cúbico $P2_1$ y unas dimensiones de celda unidad, +/- 0.1%, de $a=80.32 \text{ \AA}$, $b=143.48 \text{ \AA}$, $c=111.27 \text{ \AA}$, $\beta=98.22 \text{ \AA}$. En algunas realizaciones, la unidad asimétrica del cristal comprende dos trímeros de CD40L y seis de cada molécula de la matriz de soporte de Tn3. En otros aspectos, el cristal difracta los rayos X para determinar las coordenadas estructurales respecto a una resolución de un valor menor o igual a 1.9 \AA . 45
50

En algunos aspectos, el cristal proteico se produce utilizando difusión de vapor en gota sentada. La descripción también proporciona un método para sintetizar un cristal proteico, que comprende: (a) mezclar un volumen de una solución que comprende una matriz de soporte de Tn3 que comprende una subunidad monomérica específica para CD40L en un complejo con CD40L con un volumen de una solución de reservorio que comprende un precipitante; y 55
(b) incubar la mezcla obtenida en el paso (a) en un recipiente cerrado, en condiciones adecuadas para la cristalización hasta que se forme el cristal proteico. En algunos aspectos, el método para producir el cristal proteico comprende utilizar la difusión de vapor en gota sentada.

En algunos aspectos, el método para sintetizar un cristal proteico se utiliza para producir cristales que comprenden las subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 146.

5 La descripción también proporciona un medio de almacenamiento de datos legible mecánicamente que comprende un material de almacenamiento de datos codificado con instrucciones legibles mecánicamente para: (a) transformar los datos en una representación gráfica tridimensional para la estructura de una porción de un cristal proteico de una matriz de soporte de Tn3 que comprende una subunidad monomérica específica para CD40L en un complejo con CD40L; y (b) originar la representación visual de dicha representación gráfica tridimensional. En algunas realizaciones, dicha matriz de soporte de Tn3 comprende la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 146. En otros aspectos, dicho cristal proteico es:

10 (a) un cristal proteico que comprende una matriz de soporte de Tn3 que consiste en la SEQ ID NO: 20 en un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) donde el cristal tiene una red cristalina en un grupo espacial ortorrómbico $P2_12_12_1$ y unas dimensiones de celda unidad, +/- 0.1%, de $a=85.69 \text{ \AA}$, $b=90.64 \text{ \AA}$ y $c=95.56 \text{ \AA}$;

15 (b) un cristal proteico que comprende una matriz de soporte de Tn3 que consiste en la SEQ ID NO: 68 en un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) donde el cristal tiene una red cristalina en un grupo espacial cúbico $P2_13$ y unas dimensiones de celda unidad, +/- 0.1%, de $a=b=c=97.62 \text{ \AA}$; o

(c) un cristal proteico que comprende una matriz de soporte de Tn3 que consiste en la SEQ ID NO: 20 y una matriz de soporte de Tn3 que consiste en la SEQ ID NO: 68, donde ambas matrices de soporte de Tn3 forman un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2)

20 (d) un cristal proteico que comprende una matriz de soporte de Tn3 que consiste en la SEQ ID NO: 28 o 146 en un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) donde el cristal tiene una red cristalina en un grupo espacial $P321$ y unas dimensiones de celda unidad, +/- 0.1%, de $a=95.53 \text{ \AA}$, $b=93.53 \text{ \AA}$ y $c=66.69 \text{ \AA}$

25 (e) un cristal proteico que comprende dos matrices de soporte de Tn3 diferentes que consisten en la SEQ ID NO: 68 y la SEQ ID NO: 28 o 146 en un complejo con el CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) donde el cristal tiene una red cristalina en un grupo espacial cúbico $P2_1$ y unas dimensiones de celda unidad, +/- 0.1%, de $a=80.32 \text{ \AA}$, $b=143.48 \text{ \AA}$, $c=111.27 \text{ \AA}$, $\beta=98.22 \text{ \AA}$.

La presente invención también se refleja en los siguientes apartados.

1. Una matriz de soporte de Tenascina 3 (Tn3) que comprende dos subunidades monoméricas específicas de CD40L conectadas en tándem,

30 donde la subunidad monomérica comprende siete hebras beta denominadas A, B, C, D, E, F y G, y seis regiones de bucles denominadas AB, BC, CD, DE, EF y FG, y donde la matriz de soporte de Tn3 se une específicamente a CD40L, donde la subunidad monomérica específica de CD40L comprende la secuencia de aminoácidos:

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELY₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT

donde:

35 (a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF}, y X_{FG} representan los residuos de aminoácidos presentes en las secuencias de los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente;

(b) X₁ representa el residuo aminoacídico A o T; y,

(c) la longitud del bucle n es un número entero entre 2 y 26,

40 donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID N^o: 86, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID N^o: 96 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID N^o: 9 o 139.

2. La matriz de soporte de Tn3 del apartado 1, donde la secuencia del bucle AB comprende la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle CD comprende la SEQ ID NO: 6 y la secuencia del bucle EF comprende la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 137.

45 3. La matriz de soporte de Tn3 del apartado 1 o 2, donde la subunidad monomérica específica de CD40L comprende una secuencia de SEQ ID NO: 28 o 146.

4. La matriz de soporte de Tn3 de uno cualquiera de los apartados 1-3, donde las dos subunidades monoméricas específicas de CD40L están conectadas directamente.

5. La matriz de soporte de Tn3 de uno cualquiera de los apartados 1-4, donde las dos subunidades monoméricas específicas de CD40L están conectadas por un conector.
6. La matriz de soporte de Tn3 del apartado 5, en el que el conector comprende un conector peptídico.
7. La matriz de soporte de Tn3 del apartado 5 o 6, en el que el conector peptídico comprende una secuencia $(G_mX)_n$ donde:
- 5 (a) X es serina (S), alanina (A), glicina (G), Leu (L), isoleucina (I), o valina (V);
- (b) m y n son números enteros;
- (c) m es 1, 2, 3 o 4; y
- (d) n es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.
- 10 8. La matriz de soporte de Tn3 del apartado 7, donde el conector peptídico comprende SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 143.
9. La matriz de soporte de Tn3 de uno cualquiera de los apartados 1-8, donde al menos una subunidad monomérica específica de CD40L está unida a un conector, o a un resto heterólogo.
- 15 10. La matriz de soporte de Tn3 del apartado 9, donde al menos una subunidad monomérica específica de CD40L está conjugada con PEG o una albúmina.
11. La matriz de soporte de Tn3 del apartado 10, donde la albúmina es seroalbúmina humana (HSA).
12. La matriz de soporte de Tn3 de uno cualquiera de los apartados 1-11, donde la matriz de soporte de Tn3 comprende o consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 145.
- 20 13. Una matriz de soporte de Tn3 de uno cualquiera de los apartados anteriores, para uso en un método para alterar la respuesta de señalización mediada por CD40, que comprende poner en contacto una célula que expresa CD40L con la matriz de soporte de Tn3, donde la matriz de soporte de Tn3 se une a CD40L e interrumpe la señalización mediada por CD40.
14. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una matriz de soporte de Tn3 de uno cualquiera de los apartados 1-12.
- 25 15. Un método para producir una matriz de soporte de Tn3, que comprende cultivar una célula huésped, comprendiendo dicha célula huésped un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico del apartado 14, en condiciones en las que se expresa la matriz de soporte de Tn3 codificada por la molécula de ácido nucleico.
- 30 16. Una composición que comprende una matriz de soporte de Tn3 de uno cualquiera de los apartados 1-12 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. La composición del apartado 16, para uso en:
- 1) un método para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad autoinmune en un paciente que lo necesite; o
- 2) un método para reducir la frecuencia o cantidad de corticosteroides administrados a un paciente con una enfermedad autoinmune, opcionalmente
- 35 en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmunes, síndrome de Sjogren, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrolental, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluyendo la enfermedad de Graves), trasplante de córnea y otros tejidos, e inflamación crónica, sepsis, artritis reumatoide, peritonitis, enfermedad de Crohn, lesión por reperfusión, septicemia, choque endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (por ejemplo, artritis psoriásica), choque anafiláctico, isquemia de órganos, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo del aloinjerto. trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, esprue-dermatitis celíaca, síndrome de disfunción inmunológica por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopenia idiopática (PTI), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus

eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conjuntivo mixta, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, panarteritis nudosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme, vasculitis, vitiligo, y granulomatosis de Wegener.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

A los efectos de ilustración de la invención, en los dibujos se representan ciertas realizaciones de la invención.

- 10 La FIG. 1A muestra la inhibición de la expresión de CD86 inducida por CD40L murino (MuCD40L) medida utilizando un ensayo de D10G4.1/PBMC (siglas en inglés de las células mononucleares de sangre periférica). Se ensayaron la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L de ratón M13, su variante con afinidad optimizada M31 (aproximadamente una mejora de la afinidad de 20x), el anticuerpo monoclonal anti-CD40L MR1 y un control negativo. También se muestran los valores de CI_{50} .
- 15 La FIG. 1B muestra la inhibición de CD40L en un ensayo de NfκB murino. El ensayo emplea células NIHT3T que expresan el CD40R murino y que contienen un constructo indicador de NfκB-luciferasa. La adición de CD40L produce señalización (medida como la actividad luciferasa) que es inhibida tanto por el anticuerpo anti-CD40L MR1 como por la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L M31.
- 20 La FIG. 2A muestra el diseño de matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L bivalentes en tándem y constructos de fusión de albúmina sérica (SA, por sus siglas en inglés).
- 25 La FIG. 2B muestra el análisis por SDS-PAGE de un constructo M13 monovalente purificado (constructo de Tn3 específico para CD40L) o matrices de soporte bivalentes en tándem con conectores que contienen 1, 3, 5 o 7 unidades de Gly₄Ser (denominadas GS) que unen dos subunidades monoméricas M13 de Tn3. El constructo M13 monovalente se analizó en la calle 2, el constructo dimérico con 1 unidad de GS (C1) se analizó en las calles 3 y 7, el constructo dimérico con 3 unidades de GS (C2) se analizó en las calles 4 y 8, el constructo dimérico con 5 unidades de GS (C3) se analizó en las calles 5 y 9, y el constructo dimérico con 7 unidades de GS (C4) se analizó en las calles 6 y 10. Las muestras se analizaron en condiciones no reducidas (calles 2-6) o condiciones reducidas (calles 7-10).
- 30 La FIG. 2C muestra la inhibición competitiva de la unión del CD40L murino al receptor CD40 murino inmovilizado en un chip biosensor por parte de las matrices de soporte específicas para CD40L murino monovalentes (M13) o bivalentes en tándem (M13-xGS-M13, donde x es 1, 3, 5 o 7, correspondientes a matrices de soporte bivalentes con conectores que contienen 1, 3, 5 o 7 unidades de Gly₄Ser). También se indica la concentración que produce el 50% de inhibición (CI_{50}) para los diferentes constructos.
- 35 La FIG. 2D muestra el efecto inhibitorio de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L murino monovalentes (M13) y bivalentes en tándem sobre la expresión de CD86 inducida por CD40L murino en linfocitos B. Se proporcionan los valores de CI_{50} para todos los constructos de Tn3 y para el anticuerpo anti-CD40L murino MR1.
- 40 La FIG. 3A muestra unos niveles de expresión elevados de la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L bivalente en tándem fusionada con albúmina sérica de ratón (MSA, por sus siglas en inglés) en células HEK 293. Estos constructos tienen 1 repetición (G₄S) en el conector entre las unidades de matriz de soporte de Tn3 y 3 repeticiones (G₄S) en el conector entre la matriz de soporte de Tn3 y MSA. Además, el constructo contiene una mutación N49Q en cada una de las matrices de soporte M13 y M31 para eliminar un sitio de N-glicosilación potencial. Se analizaron 10 μL de sobrenadante de cultivo extraídos 3 o 6 días después de la transfección en un gel de SDS-PAGE junto con cantidades conocidas de la proteína purificada. El nivel de expresión se estimó que era de 200 mg/L 6 días después de la transfección. La purificación se llevó a cabo mediante IMAC a través de un marcador His C-terminal.
- 45 La FIG. 3B muestra la inhibición de la expresión de CD86 inducida por CD40L murino (MuCD40L) medida utilizando un ensayo de D10G4.1/células PBMC. Se ensayaron una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L bivalente en tándem (M13-1GS-M13), el mismo constructo fusionado con albúmina sérica de ratón (MSA) (M13-1GS-M13-MSA) y el anticuerpo monoclonal anti-CD40L murino MR1. Se proporcionan los valores de CI_{50} para todos los constructos.
- 50 La FIG. 3C muestra la inhibición de la expresión de CD86 inducida por CD40L murino (MuCD40L) medida utilizando un ensayo de D10G4.1/células PBMC. Se ensayaron una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L bivalente en tándem (M13-1GS-M13) fusionada con albúmina sérica de ratón (MSA) (M13-1GS-M13-MSA), una variante con afinidad madura de la matriz de soporte M13 conjugada con MSA (M31Mono-MSA), una matriz de soporte bivalente en tándem que comprende la variante con afinidad optimizada M31 conjugada con MSA (M31-1GS-M31-MSA), una matriz de soporte bivalente en tándem de control negativo que no se une a CD40L murino (D1-1GS-D1-MSA) y el anticuerpo monoclonal MR1. Se proporcionan los valores de CI_{50} .

La FIG. 4A muestra las propiedades farmacocinéticas de varios constructos específicos para CD40L murino en ratones según se determinaron mediante ELISA. Se indican los valores de la semivida ($t_{1/2}$) plasmática para cada constructo.

5 La FIG. 4B muestra las propiedades farmacocinéticas de 342-HSA específico para CD40L humano y una variante de 342-HSA que comprende la sustitución de Leu en la posición 463 por Asn (L463N) y la sustitución de Lys en la posición 524 por Leu (K524L) en monos cinomólogos según se determinaron mediante ELISA.

La FIG. 5A muestra la maduración de los linfocitos B en los centros germinales (GC, por sus siglas en inglés) de un ensayo de inmunización con eritrocitos de oveja (SRBC, por sus siglas en inglés). Se ensayó el anticuerpo monoclonal anti-CD40L murino MR1.

10 La FIG. 5B muestra la maduración de los linfocitos B en los centros germinales (GC, por sus siglas en inglés) de un ensayo de inmunización con eritrocitos de oveja (SRBC, por sus siglas en inglés). Se ensayaron constructos monovalentes y divalentes derivados de M31 fusionados con MSA. El constructo bivalente D1-D1 conjugado con MSA se utilizó como control negativo.

15 La FIG. 5C muestra la maduración de los linfocitos B en la periferia (no GC) de un ensayo de inmunización con eritrocitos de oveja (SRBC). Se ensayaron constructos monovalentes y divalentes derivados de M31 fusionados con MSA. El constructo bivalente D1-D1 conjugado con MSA se utilizó como control negativo.

La FIG. 5D muestra el porcentaje (% de CD4) y el número (# de CD4) de células positivas para CD4 de un ensayo de inmunización con eritrocitos de oveja (SRBC). Se ensayaron constructos monovalentes y bivalentes derivados de M31 fusionados con MSA, y los anticuerpos monoclonales anti-CD40L MR1. El constructo bivalente D1-D1 conjugado con MSA se utilizó como control negativo.

20 La FIG. 5E muestra el porcentaje (% de CD44hi) y el número (# de CD44hi) de células positivas para CD44hi de un ensayo de inmunización con eritrocitos de oveja (SRBC). Se ensayaron constructos monovalentes y bivalentes derivados de M31 fusionados con MSA, y los anticuerpos monoclonales anti-CD40L MR1. El constructo bivalente D1-D1 conjugado con MSA se utilizó como control negativo.

25 La FIG. 5F muestra la cantidad de IgG anti-SRBC de un ensayo de inmunización con eritrocitos de oveja (SRBC). Se ensayaron constructos monovalentes y divalentes derivados de M31 fusionados con MSA. El constructo bivalente D1-D1 conjugado con MSA se utilizó como control negativo.

La FIG. 5G muestra los títulos de IgM anti-KLH de un modelo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T específicos para KLH (TDAR, por sus siglas en inglés). Se ensayaron constructos monovalentes y divalentes derivados de 342 fusionados con HSA.

30 La FIG. 5H muestra los títulos de IgG anti-KLH de un modelo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T específicos para KLH (TDAR, por sus siglas en inglés). Se ensayaron constructos monovalentes y divalentes derivados de 342 fusionados con HSA.

35 La FIG. 6A muestra el efecto inhibitorio de las matrices de soporte de Tn3 monoméricas específicas para CD40L humano monovalentes 309 y 311 sobre la expresión de CD86 inducida por CD40L humano en PBMC humanas positivas para CD19 estimuladas con células D1.1 Jurkat.

La FIG. 6B muestra el efecto inhibitorio de las matrices de soporte de Tn3 monoméricas específicas para CD40L humano monovalentes 309 y 311 sobre la proliferación de linfocitos B estimulada con CD40L humano.

40 La FIG. 6C muestra el efecto inhibitorio de las matrices de soporte de Tn3 monoméricas específicas para CD40L humano monovalentes 309 y 311 sobre el número de células en plasma en cocultivos de linfocitos T/B. También se demostró que la matriz de soporte de Tn3 309 se une a linfocitos T primarios activados por FACS (los datos no se muestran). Se utilizó una matriz de soporte D1 ("Neg Tn3") como control. También se utilizaron dos anticuerpos monoclonales contra CD40L, denominados aCD40L(RE) y aCD40L(Bio) (anticuerpo monoclonal anti-CD40L humano 5c8 de Biogen) como controles.

45 La FIG. 7A muestra que las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano monovalentes 309 y 311 tienen características biofísicas similares. Ambas matrices de soporte se monodispersan según se midió mediante SEC.

50 La FIG. 7B muestra que las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano monovalentes 309 y 311 tienen características biofísicas similares. Ambas matrices de soporte tienen una termoestabilidad similar a la matriz de soporte de Tn3 original (denominada Tn3 (natural) en el gráfico) según se midió mediante calorimetría diferencial de barrido (CDB).

La FIG. 8A muestra la inhibición de la expresión de CD86 inducida por CD40L humano sobre células PBMC positivas para CD19 humanas estimuladas con células Jurkat D1.1. Se ensayaron matrices de soporte de Tn3 específicas para

CD40L humano monovalentes (311) y bivalentes (311_3GS y 311_7GS). Se muestran los valores de CI_{50} para cada constructo.

5 La FIG. 8B muestra la inhibición de la expresión de CD86 inducida por CD40L humano sobre células PBMC positivas para CD19 humanas estimuladas con células Jurkat D1.1. Se ensayaron las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano monovalentes (309) y bivalentes (309_3GS y 309_7GS), así como también el anticuerpo monoclonal anti-CD40L humano 5c8 de Biogen. Se muestran los valores de CI_{50} para cada constructo y el anticuerpo.

10 La FIG. 9A muestra el diseño de una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L humano bivalente en tándem representativa fusionada con albúmina sérica humana (HSA). "GGGGG" (SEQ ID NO: 148) y "GGGGA" (SEQ ID NO: 149) son conectores alternativos a los conectores "GGGGS" (SEQ ID NO: 147).

La FIG. 9B muestra una purificación de prueba de células 293F en una columna IEX. La fracción del hombro (<10% del pico mayoritario) contiene proteína O-glicosilada unida a residuos de serina presentes en los conectores.

15 La FIG. 9C muestra la inhibición de la expresión de CD86 inducida por CD40L humano sobre células PBMC positivas para CD19 humanas estimuladas con células Jurkat D1.1. Se ensayaron una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L humano bivalente (309), la misma matriz de soporte fusionada con HSA y el anticuerpo monoclonal anti-CD40L humano 5c8 de Biogen.

20 La FIG. 9D muestra la inhibición de la expresión de CD86 inducida por CD40L humano sobre células PBMC positivas para CD19 humanas estimuladas con células Jurkat D1.1. Se evaluaron tres matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano bivalentes (309). Había tres repeticiones (G_4S) presentes en el conector entre las subunidades específicas para CD40L humano (309 en este ejemplo), mientras que el conector entre las subunidades 309 y la HSA variaba entre 1 y 3 repeticiones (G_4S). También se ensayó el anticuerpo monoclonal anti-CD40L humano 5c8 de Biogen.

25 La FIG. 10A muestra el efecto de las secuencias de los bucles mutantes de 309 (panel de la izquierda) y 311 (panel de la derecha) sobre la unión de CD40L. La unión indica la intensidad de la señal en el ensayo de unión. WT es la variante con la secuencia líder original (secuencia de Tn3 original), mientras que BC, DE y FG denotan variantes en las que la secuencia del bucle BC, DE o FG se han modificado respecto a la secuencia de Tn3 original tal como está presente en la tenascina C humana.

30 La FIG. 10B muestra los perfiles de inhibición de un panel de matrices de soporte con afinidad optimizada según se midieron en función de la expresión de CD86 inducida por CD40L humano en células PBMC positivas para CD19 humanas estimuladas con células D1.1 Jurkat. Los monómeros de Tn3 específicos para CD40L humano correspondientes al clon 309 tenían afinidad optimizada. Los monómeros con afinidad optimizada se denominan del clon 340 al clon 349. El constructo del clon 309wtFG tenía todo el bucle FG reemplazado por el bucle FG de la matriz de soporte de Tn3 original. También se ensayó el anticuerpo monoclonal anti-CD40L 5c8.

35 La FIG. 10C muestra los perfiles de inhibición según se midieron en función de la expresión de CD86 inducida por CD40L humano sobre células PBMC positivas para CD19 humanas estimuladas con células Jurkat D1.1. Se muestran el perfil del monómero de Tn3 específico para CD40L humano 311, su variante K4E y un control negativo.

40 La FIG. 10D muestra los perfiles de inhibición según se midieron en función de la expresión de CD86 inducida por CD40L humano sobre células PBMC positivas para CD19 humanas estimuladas con células Jurkat D1.1. Se muestran el perfil del monómero de Tn3 específico para CD40L humano 311K4E, el monómero con afinidad optimizada 311K4E_12 y el anticuerpo monoclonal anti-CD40L 5c8. También se presentan las CI_{50} para los dos constructos y el anticuerpo.

45 La FIG. 11A y la FIG. 11B muestran un alineamiento de múltiples secuencias de la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L original 309, la variante 309FGwt y las variantes con afinidad optimizada 340-349. Los residuos aminoacídicos 1-42 se muestran en la FIG. 11A y los residuos aminoacídicos 43-83 se muestran en la FIG. 11B. Los bucles de las variantes están ensombrecidos. La secuencia de aminoácidos consenso se presenta debajo del alineamiento de múltiples secuencias. Las secuencias alineadas corresponden a las secuencias de aminoácidos de los clones correspondientes a matrices de soporte de Tn3 309 (SEQ ID NO: 20), 309FGwt (SEQ ID NO: 22), 340 (SEQ ID NO: 24), 341 (SEQ ID NO: 26), 342 (SEQ ID NO: 28), 343 (SEQ ID NO: 30), 344 (SEQ ID NO: 32), 345 (SEQ ID NO: 34), 346 (SEQ ID NO: 36), 347 (SEQ ID NO: 38), 348 (SEQ ID NO: 40) y 349 (SEQ ID NO: 42).

50 La FIG. 12A y la FIG. 12B muestran un alineamiento de múltiples secuencias de la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L original 311, la variante 311K4E y las variantes con afinidad optimizada 311K4E_1-311K4E_21. Los residuos aminoacídicos 1-44 se muestran en la FIG. 12A y los residuos aminoacídicos 45-87 se muestran en la FIG. 12B. Los bucles de las variantes están ensombrecidos. Las variaciones de aminoácidos fuera de los bucles ensombrecidos están en recuadros. Se presenta una secuencia consenso debajo del alineamiento de múltiples secuencias. Las secuencias alineadas corresponden a las secuencias de aminoácidos de los clones correspondientes

55

5 a matrices de soporte de Tn3 311 (SEQ ID NO: 44), 311K4E (SEQ ID NO: 46), 311K4E_1 (SEQ ID NO: 48), 311K4E_2 (SEQ ID NO: 50), 311K4E_2 (SEQ ID NO: 52), 311K4E_3 (SEQ ID NO: 54), 311K4E_4 (SEQ ID NO: 56), 311K4E_5 (SEQ ID NO: 58), 311K4E_7 (SEQ ID NO: 60), 311K4E_8 (SEQ ID NO: 62), 311K4E_9 (SEQ ID NO: 64), 311K4E_10 (SEQ ID NO: 66), 311K4E_11 (SEQ ID NO: 68), 311K4E_12 (SEQ ID NO: 70), 311K4E_13 (SEQ ID NO: 72), 311K4E_14 (SEQ ID NO: 74), 311K4E_15 (SEQ ID NO: 76), 311K4E_16 (SEQ ID NO: 78), 311K4E_19 (SEQ ID NO: 80), 311K4E_20 (SEQ ID NO: 82) y 311K4E_21 (SEQ ID NO: 84).

10 La FIG. 13 muestra un ensayo de inhibición de NfκB humano que emplea células HEK293 que expresan el receptor CD40 humano y que contienen un constructo indicador de NfκB-luciferasa. La adición de CD40L humano provoca señalización (medida como la actividad luciferasa) que se puede inhibir con moléculas que se unen a CD40L. Se ensayaron las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L 340 y 342, así como también el anticuerpo monoclonal anti-CD40L 5c8.

15 La FIG. 14 muestra la unión de matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano a linfocitos T CD4+ humanos activados con anti-CD3/28 durante 24 h. Se ensayaron una matriz de soporte monovalente 342 fusionada con HSA (denominada 342-HSA) y una matriz de soporte bivalente 342 fusionada con HSA (denominada 342-342-HSA).

La FIG. 15 muestra la inhibición de la proliferación de linfocitos T/B humanos primarios el día 3. Se ensayaron una matriz de soporte monovalente 340 fusionada con HSA (340-HSA), una matriz de soporte monovalente 342 fusionada con HSA (342-HSA) y una matriz de soporte bivalente 342 fusionada con HSA (342-342-HSA). Se muestran los valores de CI_{50} para cada constructo.

20 La FIG. 16A muestra un ensayo de agregación en plaquetas lavadas. El gráfico muestra una agregación inducida por ADP representativa como control positivo para un donante (los tres trazos superiores, respectivamente, ADP: 0.5 μ M, 1 μ M y 2 μ M) junto con el complejo inmunitario (CI) del anticuerpo monoclonal 5c8 (600 nM) y el CD40L humano soluble (200 nM).

25 La FIG. 16B muestra un ensayo de agregación en plaquetas lavadas. El gráfico muestra una falta de agregación cuando se utilizaron complejos inmunitarios preformados de las matrices bivalentes 309-309 (no fusionadas con HSA) y el CD40L humano soluble. La concentración de CD40L humano (forma soluble) se mantuvo constante a 600 nM, y la concentración de los constructos de las matrices de soporte varió entre 200 nM y 800 nM.

30 La FIG. 16C muestra un ensayo de agregación en plaquetas lavadas. El gráfico muestra una falta de agregación cuando se utilizaron complejos inmunitarios preformados de las matrices monovalentes 342 fusionadas con HSA y el CD40L humano soluble. La concentración de CD40L humano (forma soluble) se mantuvo constante a 600 nM, y la concentración de los constructos de las matrices de soporte varió entre 100 nM y 400 nM. El gráfico también muestra la rápida agregación inducida por el complejo inmunitario del anticuerpo monoclonal 5c8 de Biogen y el CD40L humano soluble.

35 La FIG. 17A muestra una representación de cintas de la estructura cristalina del CD40L soluble en un complejo con la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L monomérica 309. El CD40L forma un trímero (polipéptidos A, B y C). Cada matriz de soporte 309 (polipéptidos D, E y F, indicados con círculos) está en contacto con dos polipéptidos de CD40L. Se enumeran los contactos específicos entre cada matriz de soporte 309, y los primeros y segundos polipéptidos de CD40L. Esta es una vista "desde arriba hacia abajo" de la estructura.

40 La FIG. 17B muestra una representación de cintas de la estructura cristalina del CD40L soluble en un complejo con la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L monomérica 311K4E_12. El CD40L forma un trímero (polipéptidos A, B y C). Cada matriz de soporte monomérica 311K4E_12 (polipéptidos D, E y F, indicados con círculos) está en contacto con dos polipéptidos de CD40L. Se enumeran los contactos específicos entre cada matriz de soporte monomérica 311K4E_12, y el primer y el segundo polipéptido de CD40L. Esta es una vista "desde arriba hacia abajo" de la estructura.

45 La FIG. 17C muestra una representación de cintas que ilustra que las matrices de soporte 311K4E_12 y 309 (indicadas con círculos) se unen a epítomos diferentes situados en partes diferentes del complejo trímero de CD40L. Ambas matrices de soporte se unen en el mismo surco que interaccionaría con el receptor CD40. Esta es una vista "lateral" de la estructura.

50 La FIG. 17D muestra una representación de cintas de la estructura cristalina del CD40L soluble en un complejo con la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L monomérica 342. Solamente se muestran un CD40L y una matriz de soporte monomérica 342. Se enumeran los contactos específicos entre la matriz de soporte monomérica 342 y los primeros polipéptidos de CD40L.

La FIG. 17E muestra una representación de cintas que ilustra que las matrices de soporte 342 y 311K4E_12 se pueden unir simultáneamente a epítomos diferentes situados en partes diferentes del complejo trímero de CD40L. Ambas

matrices de soporte se unen en el mismo surco que interaccionaría con el receptor CD40. Esta es una vista "lateral" de la estructura.

La FIG. 18A muestra la localización de los contactos entre los aminoácidos en la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L monomérica 311K4E_12 (SEQ ID NO: 68) y un trímero formado por moléculas de CD40L soluble (SEQ ID NO: 2) tal como se muestra en la FIG. 17A. Cada matriz de soporte está en contacto con 2 moléculas de CD40L. Se muestra la secuencia de CD40L (SEQ ID NO: 2). Subrayado con línea punteada = dominio citoplasmático; subrayado con línea continua = proteína de membrana de tipo II con señal de anclaje; subrayado doble = porción cocrystalizada con la matriz de soporte de Tn3; ensombrecido oscuro = residuos en el 1.º CD40L que entran en contacto con Tn3; ensombrecido claro = residuos en el 2.º CD40L que entran en contacto con Tn3.

La FIG. 18B muestra la localización de los contactos entre los aminoácidos en la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L monomérica 309 y el trímero de CD40L tal como se muestra en la FIG. 17B. Cada matriz de soporte está en contacto con 2 moléculas de CD40L. Se muestra la secuencia de CD40L (SEQ ID NO: 2). Subrayado con línea punteada = dominio citoplasmático; subrayado con línea continua = proteína de membrana de tipo II con señal de anclaje; subrayado doble = porción cocrystalizada con la matriz de soporte Tn3; ensombrecido oscuro = residuos en el 1.º CD40L que entran en contacto con Tn3; ensombrecido claro = residuos en el 2.º CD40L que entran en contacto con Tn3; el residuo en un recuadro doble está en contacto con el bucle FG de la matriz de soporte 309, que probablemente no se conserva en clones con un bucle FG natural.

En la FIG. 19. el Panel A muestra un cromatograma ilustrativo de la elución de la matriz de soporte Tn3 (309 o 311K4E_12), CD40L y el complejo entre ellos a la salida de la columna GL Superdex 200 10/300 de exclusión por tamaños. El Panel B muestra cristales del complejo de 309-CD40L. El cristal que se muestra creció hasta alcanzar unas dimensiones de hasta 0.15 x 0.15 x 0.1 mm. El Panel C muestra cristales del complejo de 311K4E_12-CD40L.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Cabe destacar que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un/a" y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "un" (o "una"), así como las expresiones "uno o más" y "al menos un" se pueden utilizar indistintamente en la presente.

Además, cuando se utilice "y/o" en la presente se debe interpretar como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Así pues, se pretende que el término "y/o", según se utiliza en una frase tal como "A y/o B" de la presente, incluya "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). De modo similar, se pretende que el término "y/o", según se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C", incluya cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que interpreta comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere esta descripción. Por ejemplo, el *Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, Juo, Pei-Show, 2.ª ed., 2002, CRC Press; *The Dictionary of Cell and Molecular Biology*, 3.ª ed., 1999, Academic Press; y el *Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology*, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan al experto un diccionario general con muchos de los términos utilizados en esta invención.

Las unidades, prefijos y símbolos se representan con su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi. Los encabezamientos que se proporcionan en la presente no son limitaciones de los diferentes aspectos o realizaciones de la invención, los cuales se pueden considerar por referencia a la memoria descriptiva en conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más detalladamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Se sobreentenderá que cuando se describan realizaciones en la presente con la expresión "que comprende", también se proporcionarán realizaciones por lo demás análogas descritas en términos de "constituido por" y/o "constituido esencialmente por".

En la presente, se hace referencia a los aminoácidos ya sea mediante sus símbolos de tres letras conocidos habitualmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. De modo similar, se hace referencia a los nucleótidos mediante sus códigos de una única letra aceptados habitualmente.

El término "epítipo", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un determinante proteico capaz de unirse a una matriz de soporte de la invención. Los epítipos están constituidos normalmente por agrupaciones superficiales

químicamente activas de moléculas tales como cadenas laterales de azúcares o aminoácidos y normalmente tienen unas características estructurales tridimensionales específicas, así como también unas características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se diferencian en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

5 Las expresiones "dominio de fibronectina de tipo III (FnIII)" "dominio FnIII" y "matriz de soporte de FnIII" se refieren a polipéptidos homólogos al dominio de la fibronectina humana de tipo III que contiene al menos 7 hebras beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que a su vez están empaquetadas la una contra la otra para formar el núcleo de la proteína, y que además contienen bucles expuestos al disolvente que conectan las hebras beta entre sí. Hay al menos tres de estos bucles en cada borde del sándwich de láminas beta, donde el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta. En ciertas realizaciones, un dominio FnIII comprende 7 hebras beta, denominadas A, B, C, D, E, F y G, unidas a seis regiones de bucles, denominadas AB, BC, CD, DE, EF y FG, donde una región de bucle conecta cada hebra beta.

15 La expresión "matriz de soporte de Tn3", tal como se utiliza en la presente, se refiere a moléculas que comprenden al menos una matriz de soporte de FnIII, donde la hebra beta A comprende la SEQ ID NO: 11, la hebra beta B comprende la SEQ ID NO: 12, la hebra beta C comprende la SEQ ID NO: 13 o 14, la hebra beta D comprende la SEQ ID NO: 15, la hebra beta E comprende la SEQ ID NO: 16, la hebra beta F comprende la SEQ ID NO: 17 y la hebra beta G comprende la SEQ ID NO: 18, donde al menos un bucle es una variante de origen no natural de los bucles en la "matriz de soporte de Tn3 original". En ciertas realizaciones, una o más de las hebras beta de un módulo de Tn3 comprenden al menos una sustitución aminoacídica, salvo que los residuos de cisteína en la hebra beta C (p. ej., la cisteína en las SEQ ID NOs: 13 o 14) y la hebra beta F (SEQ ID NO: 17) no están sustituidos.

La expresión "Tn3 original", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una matriz de soporte de FnIII que comprende la SEQ ID NO: 3, es decir, una matriz de soporte de FnIII con modificación cisteínica estabilizada térmicamente derivada del 3.º dominio FnIII de la tenascina C humana.

25 Las expresiones "multímero" o "matriz de soporte multimérica" se refiere a una molécula que comprende al menos dos matrices de soporte de FnIII asociadas. Las matrices de soporte que forman una matriz de soporte multimérica se pueden unir a través de un conector que permita a cada matriz de soporte funcionar de forma independiente.

Las expresiones "monómero", "subunidad monomérica" o "matriz de soporte monomérica" se refieren a una molécula que comprende únicamente una matriz de soporte de FnIII.

30 La expresión "subunidad monomérica específica para CD40L", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un monómero de Tn3 derivado de una "Tn3 original" donde el monómero de Tn3 se une específicamente a CD40L o un fragmento de este, p. ej., una forma soluble de CD40L.

El término "ADN" se refiere a una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos naturales o modificados unidos covalentemente.

35 La expresión "proteína de fusión" se refiere a una proteína que incluye (i) una o más matrices de soporte de la invención unidas a (ii) una segunda proteína diferente (es decir, una proteína "heteróloga").

TABLA 1: Secuencias y SEQ ID NOs de los componentes de "Tn3 original"

Nombre/Descripción breve	Secuencia	SEQ ID NO
Tn3	IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNL KPDTEYEVSLIQRGRDMSSNPAKETFTT (los residuos cys del enlace disulfuro están subrayados)	3
3.º FnIII de tenascina C, bucle AB (Tn3)	KDVTDTT	4
3.º FnIII de tenascina C, bucle BC (Tn3)	FKPLAEIDG	5
3.º FnIII de tenascina C, bucle CD (Tn3)	KDVPGDR	6
3.º FnIII de tenascina C, bucle DE (Tn3)	TEDENQ	7

3. ^{er} FnIII de tenascina C, bucle EF (Tn3)	GNLKPDTE	8
3. ^{er} FnIII de tenascina C, bucle FG (Tn3)	RRGDMSSNPA	9
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta A (Tn3)	RLDAPSQIEV	10
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta A (Tn3) truncación N-terminal	IEV	11
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta B (Tn3)	ALITW	12
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta C (variante de Tn3)	CELAYGI	13
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta C (Tn3)	CELYGI	14
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta D (Tn3)	TTIDL	15
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta E (Tn3)	YSI	16
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta F (Tn3)	YEVSLIC	17
3. ^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta G (Tn3)	KETFTT	18

5 La expresión "resto heterólogo" se utiliza en la presente para indicar la adición de una composición a una matriz de soporte de Tn3 de la invención, donde la composición normalmente no forma parte de un dominio FnIII. Los restos heterólogos ilustrativos incluyen proteínas, péptidos, dominios proteicos, conectores, fármacos, toxinas, contrastes, compuestos radioactivos, polímeros orgánicos e inorgánicos y cualesquiera otras composiciones que puedan proporcionar una actividad que no sea inherente en el propio dominio FnIII que incluyen, sin carácter limitante, polietilenglicol (PEG), un agente citotóxico, un radionucleido, un contraste, biotina, un dominio de dimerización (p. ej., un dominio de cremallera de leucina), albúmina sérica humana (HSA) o una de sus porciones de unión a FcRn, un dominio o fragmento de un anticuerpo (p. ej., un dominio variable de un anticuerpo, un dominio CH1, un dominio Ckappa, un dominio Clambda, un dominio CH2 o un dominio CH3), un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de un dominio, un dominio de unión a albúmina, una molécula de IgG, una enzima, un ligando, un receptor, un péptido de unión, una matriz de soporte que no sea de FnIII, un epítipo marcador, un polímero polipeptídico recombinante, una citocina y similares.

15 El término "conector", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier conjunto molecular que une o conecta dos o más matrices de soporte. El conector puede ser una molécula cuya función es actuar como un "espaciador" entre módulos en una matriz de soporte o también puede ser una molécula con una función adicional (es decir, un "resto funcional"). Una molécula incluida en la definición de "resto heterólogo" también puede funcionar como conector.

20 Los términos "unido" y "fusionado" se utilizan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión de dos o más matrices de soporte, restos heterólogos o conectores por cualquier medio, incluido un método recombinante o de conjugación química.

25 Las expresiones "dominio" o "dominio proteico" se refieren a una región de una proteína que se puede plegar en forma de una estructura tridimensional estable, normalmente independientemente del resto de la proteína, y a la cual se le puede atribuir una función particular. Esta estructura conserva una función específica asociada con la función del dominio dentro de la proteína original, p. ej., actividad enzimática, creación de un motivo de reconocimiento para otra molécula o para proporcionar los componentes estructurales necesarios para que una proteína exista en un entorno particular de proteínas. Tanto dentro de una familia de proteínas como dentro de superfamilias de proteínas

relacionadas, los dominios proteicos pueden ser regiones conservadas evolutivamente. Cuando se describe el componente de una matriz de soporte multimérica, las expresiones "dominio", "matriz de soporte monoméricas", "subunidad monoméricas" y "módulo" se pueden utilizar indistintamente. La expresión "dominio FnIII nativo" se refiere a cualquier dominio FnIII no recombinante que sea codificado por un organismo vivo.

- 5 La expresión "secuencia proteica" o "secuencia de aminoácidos" se refiere a una representación lineal de los constituyentes aminoacídicos en un polipéptido en una dirección de amino-terminal a carboxi-terminal en la que los residuos que van seguidos en la representación son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a dos o más nucleótidos unidos covalentemente, o análogos o derivados de nucleótidos cualesquiera. Esta expresión, tal como se utiliza en la presente, incluye, sin carácter limitante, ADN, ARN y APN. Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente en la presente.

Se pretende que el término "polinucleótido" abarque un ácido nucleico en singular, así como también ácidos nucleicos en plural, y se refiere a una molécula o constructo de ácido nucleico aislado, p. ej., ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). El término ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que ha sido retirada de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica, p. ej., una matriz de soporte de la invención contenida en un vector, se considera aislado a los efectos de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes conservados en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen además las moléculas de este tipo producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, un sitio de unión ribosómico o un terminador de la transcripción.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un compuesto o una proteína que se puede administrar a un animal (por ejemplo, un mamífero) sin consecuencias médicas adversas significativas.

La expresión "portador fisiológicamente aceptable" se refiere a un portador que no ejerce un impacto perjudicial significativo sobre el huésped tratado y que retiene las propiedades terapéuticas del compuesto junto al cual se administra. Un portador fisiológicamente aceptable ilustrativo es una solución salina fisiológica. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con otros portadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones, los cuales se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, (18.^a edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier secuencia de dos o más aminoácidos unidos linealmente mediante enlaces amídicos (enlaces peptídicos) independientemente de su longitud, modificación postraduccional o función. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente. Así pues, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos u oligopéptidos quedan incluidos dentro de la definición de "polipéptido" y el término "polipéptido" se puede utilizar indistintamente o en lugar de cualquiera de estos términos. Se pretende que el término "polipéptido" también haga referencia a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido que incluyen, sin carácter limitante, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos bloqueadores/protectores conocidos, escisión proteolítica o modificación mediante aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica natural o se puede producir mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Un polipéptido se puede generar de cualquier forma, incluida la síntesis química.

También se incluyen como polipéptidos de la presente invención los fragmentos, derivados, análogos o variantes de los péptidos anteriores, y cualquier combinación de estos. Las variantes pueden ser de origen natural o no natural. Las variantes de origen no natural se pueden producir mediante técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Las variantes polipeptídicas pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones aminoacídicas conservadoras o no conservadoras. También se incluyen como "derivados" aquellos péptidos que contienen uno o más derivados aminoacídicos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar.

El término "aleatorizada" o "mutada" se refiere a que se incluyen una o más alteraciones aminoacídicas, incluidas la deleción, sustitución o adición, en relación con una secuencia patrón. El término "aleatorización" o "mutación" se refiere al proceso de introducción, en una secuencia, de dicha alteración aminoacídica. La aleatorización o mutación se puede conseguir mediante una variación secuencial intencionada, oculta o espontánea, generalmente de una secuencia que codifica un ácido nucleico, y se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica, por ejemplo, PCR, PCR propensa a errores o síntesis química de ADN. Los términos "aleatorización", "aleatorizada", "mutación", "mutada" y similares se utilizan indistintamente en la presente.

Las expresiones "cognada" o "proteína no mutada cognada" se refieren a una proteína que es idéntica secuencialmente a una variante proteica, salvo por las mutaciones aminoacídicas introducidas en la variante proteica, donde la variante proteica está aleatorizada o mutada.

El término "ARN" se refiere a una secuencia de dos o más ribonucleótidos naturales o modificados unidos covalentemente. Un ejemplo de un ARN modificado incluido en este término es el ARN con enlaces fosforotioato.

5 Las expresiones "matriz de soporte de la invención" o "matrices de soporte de la invención", tal como se utilizan en la presente, se refieren a matrices de soporte de Tn3 multiméricas, así como también a matrices de soporte de Tn3 monoméricas. El término "diana" se refiere a un compuesto reconocido por una matriz de soporte específica de la invención. Los términos "diana" y "antígeno" se utilizan indistintamente en la presente. El término "especificidad", tal como se utiliza en la presente, p. ej., en las expresiones "se une específicamente" o "unión específica", se refiere a la afinidad relativa por la cual una estructura de soporte de Tn3 de la invención se une a uno o más antígenos a través de uno o más dominios de unión a antígeno, y dicha unión implica cierta complementariedad entre uno o más dominios de unión a antígeno y uno o más antígenos. De acuerdo con esta definición, se dice que una estructura de soporte de Tn3 de la invención se "une específicamente" a un epítipo cuando se une a dicho epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo no relacionado aleatorio.

15 Una matriz de soporte con "afinidad madura" es una matriz de soporte con una o más alteraciones, generalmente en un bucle, que provocan una mejora en la afinidad de la matriz de soporte de Tn3 por un epítipo en comparación con una matriz de soporte de Tn3 original que no posee dicha alteración o alteraciones.

El término "afinidad", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una medición de la fuerza de la unión de una matriz de soporte de Tn3 determinada de la invención a un epítipo individual.

20 El término "avidez", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de matrices de soporte de Tn3 de la invención y un epítipo determinado, es decir, la fuerza combinada funcionalmente de la unión de una pluralidad de matrices de soporte de Tn3 con el antígeno. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de los dominios de unión a antígeno individuales con epítopos específicos como también con la valencia de la matriz de soporte de la invención.

25 La expresión "acción sobre la diana" se refiere a la unión de una matriz de soporte de Tn3 de la invención con una o más dianas y a los efectos biológicos generados por dicha unión. A este respecto, múltiples unidades de unión a antígeno en una matriz de soporte de Tn3 pueden interactuar con diversas dianas y/o epítopos y, por ejemplo, hacer que dos dianas se acerquen físicamente, desencadenar cascadas metabólicas a través de la interacción con dianas diferentes, etc. En lo que respecta a CD40L, la expresión "acción sobre la diana" se refiere al efecto conseguido, por ejemplo, mediante el incremento, la estimulación o la activación de una o más actividades biológicas de CD40L.

30 El término "valencia", tal como se utiliza en la presente, se refiere al número de módulos de unión a antígeno potenciales, p. ej., el número de módulos de FnIII en una matriz de soporte de la invención. Cuando una matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende más de un módulo de unión a antígeno, cada módulo de unión se puede unir específicamente, p. ej., al mismo epítipo o a un epítipo diferente, en la misma diana o en dianas diferentes.

35 La expresión "enlace disulfuro", tal como se utiliza en la presente, incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol.

40 Los términos "inmunoglobulina" y "anticuerpo" comprenden múltiples clases de polipéptidos variadas que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica comprenderán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon. La naturaleza de esta cadena es la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Un experto en la técnica diferenciará fácilmente las versiones modificadas de cada una de estas clases. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente, incluye, sin carácter limitante, un anticuerpo intacto, un anticuerpo modificado, un dominio VL o VL de anticuerpo, un dominio CH1, un dominio Ckappa, un dominio Clambda y un dominio Fc (véase a continuación), un CH2 o un dominio CH3.

45 La expresión "dominio Fc", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una porción de una región constante de un anticuerpo. Tradicionalmente, la expresión "dominio Fc" se refiere a un producto de la escisión por acción de una proteasa (p. ej., la papaína) que abarca las regiones apareadas, CH2, CH3 y la región bisagra de un anticuerpo. En el contexto de esta exposición, la expresión "dominio Fc" o "Fc" se refiere a cualquier polipéptido (o ácido nucleico que codifique dicho polipéptido), independientemente del método de producción, que incluya toda o una porción de las regiones CH2, CH3 y la región de bisagra de un polipéptido inmunoglobulínico.

50 La expresión "anticuerpo modificado", tal como se utiliza en la presente, incluye las formas sintéticas de anticuerpos que están alterados de modo que no son naturales, p. ej., anticuerpos que comprenden al menos dos porciones de cadena pesada pero no dos cadenas pesadas enteras (como, p. ej., los anticuerpos con dominios eliminados o minicuerpos); formas multiespecíficas de anticuerpos (p. ej., biespecíficas, triespecíficas, etc.) alterados para que se unan a dos o más antígenos o a epítopos diferentes de un único antígeno. Además, la expresión "anticuerpo modificado" incluye las formas multivalentes de anticuerpos (p. ej., trivalentes, tetravalentes, etc.) que se unen a tres o más copias del mismo antígeno. (Remítase a, p. ej., *Antibody Engineering*, Kontermann & Dubel, eds., 2010, Springer Protocols, Springer).

La expresión "semivida *in vivo*" se utiliza con su significado habitual, es decir, el momento en el que el 50% de la actividad biológica de un polipéptido sigue estando presente en el cuerpo/órgano diana, o el momento en el que la actividad del polipéptido es el 50% de su valor inicial. Como alternativa a la determinación de la semivida *in vivo* funcional, se puede determinar la "semivida sérica", es decir, el momento en el que el 50% de las moléculas de polipéptido circulan en el plasma o el torrente sanguíneo antes de ser eliminadas. La determinación de la semivida sérica suele ser más simple que la determinación de la semivida *in vivo* funcional, y la magnitud de la semivida sérica normalmente es una buena indicación de la magnitud de la semivida *in vivo* funcional. Las expresiones alternativas a la semivida sérica incluyen "semivida plasmática", semivida circulante, semivida circulatoria, aclaramiento sérico, aclaramiento plasmático y semivida de aclaramiento. La funcionalidad que se ha de retener normalmente se selecciona entre actividad procoagulante, proteolítica, de unión a cofactores, de unión a receptores u otro tipo de actividad biológica asociada con la proteína particular.

El término "aumento" con respecto a la semivida *in vivo* funcional o semivida plasmática se utiliza para indicar que la semivida relevante del polipéptido ha aumentado significativamente desde un punto de vista estadístico en comparación con la de una molécula de referencia (por ejemplo, un polipéptido no modificado), según se determina en condiciones comparables.

El término "reducción" con respecto a la semivida *in vivo* funcional o semivida plasmática se utiliza para indicar que la semivida relevante del polipéptido se ha reducido significativamente desde un punto de vista estadístico en comparación con la de una molécula de referencia (por ejemplo, un polipéptido no modificado), según se determina en condiciones comparables.

El término "expresión", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un proceso mediante el cual un gen produce un agente bioquímico, por ejemplo, una matriz de soporte de la invención o uno de sus fragmentos. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen en la célula que incluye, sin carácter limitante, el silenciamiento génico, así como también tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Esto incluye, sin carácter limitante, la transcripción del gen en uno o más ARNm y la traducción de tales ARNm en uno o más polipéptidos. Si el producto deseado final es un agente bioquímico, la expresión incluye la creación de dicho agente bioquímico y cualquiera de sus precursores.

Un "producto de expresión" puede ser un ácido nucleico, p. ej., un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen o un polipéptido. Los productos de expresión descritos en la presente también incluyen ácidos nucleicos con modificaciones postranscripcionales, p. ej., poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, p. ej., metilación, glicosilación, la adición de lípidos, la asociación con otras subunidades proteicas, la escisión proteolítica y similares.

La expresión "vector" o "vector de expresión" se utiliza en la presente para hacer referencia a vectores utilizados de acuerdo con la presente invención como vehículo para introducir y expresar un producto de expresión deseado en una célula huésped. Como sabrán los expertos en la técnica, tales vectores se pueden seleccionar fácilmente entre el grupo constituido por plásmido, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador seleccionable, sitios de restricción adecuados para fomentar la clonación del ácido nucleico deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

La expresión "célula huésped" se refiere a células que albergan vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un producto de expresión. En las descripciones de los procesos para aislar un producto de expresión a partir de huéspedes recombinantes, las expresiones "célula" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente para denotar la fuente del producto de expresión, a menos que se especifique claramente lo contrario, es decir, la recuperación del producto de expresión a partir de las "células" se refiere a la recuperación a partir de células enteras centrifugadas o la recuperación a partir del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se utilizan en la presente, se refieren tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas preventivas o profilácticas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) un trastorno o cambio fisiológico no deseado en un sujeto, tal como el avance de una afección o enfermedad inflamatoria. Los resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, sin carácter limitante, el alivio de síntomas, la reducción del alcance de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, la ralentización o reducción del avance de la enfermedad, la mejora o paliación del estado patológico y la remisión (ya sea parcial o total), tanto detectables como no detectables.

El término "tratamiento" también se refiere a la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen la afección o trastorno, así como aquellos que son propensos a padecer la afección o trastorno, o aquellos en los que se ha de prevenir la afección o trastorno.

- 5 Los términos "sujeto", "individuo", "animal", "paciente" o "mamífero" se refieren a cualquier individuo, paciente o animal, en particular a un sujeto mamífero, para el cual se desea obtener un diagnóstico, un pronóstico o una terapia. Los sujetos mamíferos incluyen los seres humanos, animales domésticos, animales de granja y de zoológico, animales de deportes o animales de compañía tales como perros, gatos, conejillos de Indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas y demás.
- 10 El término "CD40L", tal como se utiliza en la presente, se refiere, sin carácter limitante, al CD40L expresado en la superficie de los linfocitos T, al CD40L expresado recombinantemente, al CD40L expresado y purificado a partir de *E. coli* u otros sistemas de expresión de proteínas recombinantes adecuados, el CD40L glicosilado y fragmentos solubles de CD40L. El término "CD40L", tal como se utiliza en la presente, también se refiere a MegaCD40L. MegaCD40L™ es un constructo de alta actividad en el que dos ligandos CD40 triméricos están unidos artificialmente a través del dominio de colágeno de ACRP30/adiponectina. Este constructo simula muy eficazmente la agregación asistida por la membrana natural de CD40L *in vivo*. Proporciona una alternativa simple e igualmente potente a las combinaciones de [CD40L+potenciador] (Alexis biochemicals). El término "CD40L" se refiere a las formas monoméricas de CD40L así como también a las formas oligoméricas, p. ej., CD40L trimérico.
- 15 El término "CD40L" se refiere tanto al CD40L completo como a los fragmentos solubles, p. ej., formas de dominio extracelular de CD40L generadas por proteólisis. Las secuencias de aminoácidos de las formas solubles y unidas a membrana del CD40L humano (Swissprot: P29965) se muestran en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente.
- 20 Las expresiones "antagonista de CD40L" o "antagonista" se utilizan en su sentido más amplio e incluyen cualquier molécula que inhiba, reduzca o inactive parcial o completamente una o más actividades biológicas de CD40L, y las variantes biológicamente activas de esta, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Por ejemplo, un antagonista de CD40L puede funcionar para inhibir, reducir o inactivar parcial o completamente una o más actividades biológicas de una o más moléculas de CD40L, o una o más moléculas de CD40L unidas a CD40 u otras dianas, *in vivo*, *in vitro* o *in situ*, como resultado de su unión a CD40L.
- 25 La expresión "agonista de CD40L" o "agonista" se utiliza en su sentido más amplio e incluye cualquier molécula que incremente, estimule o active parcial o completamente una o más actividades biológicas de CD40L, y las variantes biológicamente activas de esta, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Por ejemplo, un agonista de CD40L puede funcionar para incrementar, estimular o activar parcial o completamente una o más actividades biológicas de una o más moléculas de CD40L, o una o más moléculas de CD40L unidas a CD40R u otras dianas, *in vivo*, *in vitro* o *in situ*, como resultado de su unión a CD40L.
- 30 El término "cristal", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una forma de estado sólido de la materia en la que los átomos están colocados siguiendo un patrón que se repite periódicamente en tres dimensiones, normalmente formando una red.
- 35 La expresión "simetría del grupo espacial", tal como se utiliza en la presente, se refiere a toda la simetría del cristal que combina la simetría traslacional de una red cristalina con la simetría del grupo puntual. Un "grupo espacial" está designado por una letra mayúscula que identifica el grupo de la red (P, A, F, etc.) que va seguida por el símbolo del grupo puntual en el que los elementos de rotación y reflexión se extienden para incluir los ejes helicoidales y los planos de deslizamiento. Cabe destacar que la simetría del grupo puntual para un grupo espacial particular se puede determinar eliminando el símbolo de centrado de la celda del grupo espacial y reemplazando todos los ejes helicoidales por ejes de rotación similares y reemplazando todos los planos de deslizamiento por planos de espejo. La simetría del grupo puntual para un grupo espacial describe la simetría real de su red recíproca.
- 40 La expresión "celda unidad", tal como se utiliza en la presente, se refiere a los átomos de un cristal que están colocados siguiendo un patrón regular que se repite, en el cual la unidad que se repite más pequeña se denomina celda unidad. Se puede reconstituir la estructura entera si se conoce la celda unidad, que se caracteriza por tres longitudes (a, b y c) y tres ángulos (α , β y γ). Las cantidades a y b son las longitudes de los lados de la base de la celda y γ es el ángulo entre estos dos lados. La cantidad c es la altura de la celda unidad. Los ángulos α y β describen los ángulos entre la base y las caras verticales de la celda unidad.
- 45 La expresión "medio de almacenamiento de datos legible mecánicamente", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un material de almacenamiento de datos codificado con datos legibles mecánicamente, donde una máquina está programada con instrucciones para utilizar tales datos y es capaz de presentar los datos en el formato deseado, por ejemplo, una representación gráfica tridimensional de moléculas o complejos moleculares.
- 50 La expresión "patrón de difracción de rayos X" se refiere al patrón obtenido a partir de la dispersión de rayos X de la disposición periódica de moléculas o átomos en un cristal. La cristalografía de rayos X es una técnica que aprovecha el hecho de que los rayos X sean difractados por los cristales. Los rayos X tienen la longitud de onda adecuada (en el rango de angstrom, aproximadamente 10^{-8} cm) para ser dispersados por la nube electrónica de un átomo de un tamaño comparable. Basándose en el patrón de difracción obtenido a partir de la dispersión de rayos X de la disposición
- 55

periódica de moléculas o átomos en el cristal, se puede reconstruir la densidad electrónica. Se puede extraer información adicional sobre la fase ya sea a partir de los datos de difracción o a partir de experimentos de difracción complementarios para completar la reconstrucción (el problema de la fase en cristalografía). Un modelo es el que se construye progresivamente para obtener la densidad electrónica experimental, refinada frente a los datos para producir una estructura molecular precisa. Las coordenadas estructurales de rayos X definen una configuración única de puntos en el espacio. Los expertos en la técnica comprenderán que un conjunto de coordenadas estructurales para una proteína o un complejo de proteína-ligando, o una de sus porciones, definen un conjunto de puntos relativo que, a su vez, definen una configuración en tres dimensiones. Un conjunto de coordenadas completamente diferente puede definir una configuración similar o idéntica, siempre que las distancias y los ángulos entre las coordenadas sigan siendo esencialmente los mismos. Además, se puede definir una configuración de puntos al incrementar o reducir las distancias entre las coordenadas en un factor escalar, manteniendo los ángulos esencialmente iguales.

La expresión "estructura cristalina", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la disposición espacial tridimensional o en forma de red de las unidades moleculares o atómicas que se repiten en un material cristalino. La estructura cristalina de un material cristalino se puede determinar mediante métodos cristalográficos de rayos X, remítase, por ejemplo, a "Principles of Protein X-Ray Crystallography" de Jan Drenth, Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer Verlag, 2.^a ed., febrero de 1999, ISBN: 0387985875, y a "Introduction to Macromolecular Crystallography" de Alexander McPherson, Wiley-Liss, 18 de octubre de 2002, ISBN: 0471251224.

La expresión "función efectora" se refiere a aquellas actividades biológicas de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo atribuibles a la región Fc (una región Fc nativa o una secuencia de aminoácidos variante de la región Fc) de un anticuerpo y que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; reducción de la expresión de receptores de la superficie celular (p. ej., receptores de linfocitos B); y activación de los linfocitos B.

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que las Ig secretadas unidas a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (p. ej., citolíticas (NK, por sus siglas en inglés), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y subsecuentemente destruyan las células diana con citotoxinas.

La expresión "receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR puede ser un FcR humano de secuencia nativa. El FcR se puede unir a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y formas derivadas de un mecanismo corte y empalme alternativo de estos receptores. La expresión también incluye el receptor neonatal FcRn.

La expresión "secuencia consenso" se refiere a una secuencia proteica que muestra los aminoácidos más comunes en una posición particular después de alinear múltiples secuencias. Una secuencia consenso es una forma de representar los resultados de un alineamiento de múltiples secuencias, en el que se comparan entre sí secuencias relacionadas. La secuencia consenso muestra qué residuos son los más abundantes en el alineamiento en cada posición y el grado de variabilidad en cada posición.

Introducción

El CD40L (conocido también como CD154, ligando CD40, gp39 o TBAM) es una glicoproteína de membrana de tipo II de 33 kDa (Swiss-ProtAcc-No P29965). Además, existen formas solubles de CD40L más cortas de 18 kDa (también conocidas como sCD40L o CD40L soluble). Estas formas solubles de CD40L se generan mediante el procesamiento proteolítico de la proteína unida a la membrana, pero la actividad celular de las especies solubles es débil en ausencia de oligomerización de orden superior (p. ej., trimerización).

La presente invención proporciona una familia de matrices de soporte proteicas de origen no natural recombinantes (matrices de soporte de Tn3) que pueden unirse a CD40L. En particular, las proteínas descritas en la presente se pueden utilizar para presentar bucles definidos que son análogos a las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR", por sus siglas en inglés) de una región variable de un anticuerpo. Estos bucles se pueden someter a aleatorización o evolución restringida para generar una variedad capaz de unirse a multitud de compuestos diana. Las matrices de soporte de Tn3 se pueden utilizar como monómeros o se pueden disponer como matrices multiméricas capaces de unirse a CD40L.

En realizaciones específicas, la invención proporciona ligantes específicos para CD40L que son útiles para prevenir, mejorar, detectar, diagnosticar o monitorizar enfermedades, tales como, sin carácter limitante, las enfermedades autoinmunitarias. En otras realizaciones específicas, las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L de la invención son útiles para tratar enfermedades y afecciones autoinmunitarias. En algunas realizaciones, las enfermedades autoinmunitarias pueden incluir, sin carácter limitante, el lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y rechazo de aloinjerto.

Las matrices de soporte de Tn3 de la invención comprenden subunidades monoméricas específicas para CD40L derivadas del tercer dominio FnIII de la tenascina C humana, en las que al menos se ha creado un enlace disulfuro intramolecular de origen no natural. Las subunidades monoméricas que constituyen las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pliegan correctamente de forma independiente unas de otras, retienen su especificidad y afinidad de unión, y cada una de las matrices monoméricas retiene sus propiedades funcionales. Cuando las subunidades monoméricas se disponen en matrices de soporte de Tn3 multiméricas de valencia alta, las subunidades monoméricas se pliegan correctamente de forma independiente unas de otras, retienen su especificidad y afinidad de unión, y cada uno de los monómeros retiene sus propiedades funcionales.

Las matrices de soporte de Tn3 de la invención que comprenden más de una subunidad monomérica se pueden unir a múltiples epítomos, p. ej., (i) se unen a múltiples epítomos en una única diana, (ii) se unen a un único epítopo en múltiples dianas, (iii) se unen a múltiples epítomos situados en subunidades diferentes de una diana o (iv) se unen a múltiples epítomos en múltiples dianas, y de este modo se incrementa la avidéz.

Además, debido a la posibilidad de variar la distancia entre múltiples monómeros mediante conectores, las matrices de soporte de Tn3 multiméricas son capaces de unirse a múltiples moléculas diana en una superficie (ya sea en la misma célula/superficie o en células/superficies diferentes). Como resultado de su capacidad para unirse simultáneamente a más de una diana, una matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención se puede utilizar para modular múltiples vías, entrecruzar receptores en una superficie celular, unir receptores de la superficie celular en células independientes y/o unir moléculas o células diana a un sustrato.

Además, la presente invención proporciona matrices de soporte con afinidad madura en las que se modula la afinidad de una matriz de soporte por una diana específica mediante mutación. Asimismo, la descripción proporciona métodos para producir las matrices de soporte de la invención así como también métodos para diseñar matrices de soporte con propiedades fisicoquímicas, farmacológicas o inmunológicas deseables. Además, la presente descripción proporciona usos de tales matrices de soporte y métodos para su uso terapéutico, profiláctico y diagnóstico.

El motivo estructural FnIII

Las matrices de soporte de Tn3 de la presente invención se basan en la estructura de un módulo de fibronectina de tipo III (FnIII), un dominio presente en los tres dominios de vida y virus, y en muchas clases de proteínas. En realizaciones específicas, las matrices de soporte de la invención se derivan del tercer dominio FnIII de la tenascina C humana (remítase a la Solicitud Internacional N.º PCT/US2008/012398, publicada como WO 2009/058379; la Solicitud Internacional N.º PCT/US2011/032184, publicada como WO 2011/130324; y la Solicitud Internacional N.º PCT/US2011/032188, publicada como WO2011130328).

En una realización específica, las matrices de soporte de Tn3 de la invención comprenden una subunidad monomérica específica para CD40L derivada de una matriz de soporte de Tn3 original. El pliegue tridimensional global del monómero está estrechamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de la cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés), que en los anticuerpos de camellos y camélidos (p. ej., llamas) comprende la unidad de reconocimiento de antígeno completa.

Las subunidades monoméricas de Tn3 de la invención y el dominio FnIII nativo de la tenascina C se caracterizan por la misma estructura tridimensional, concretamente, una estructura de beta-sándwich con tres hebras beta (A, B y E) en un lado y cuatro hebras beta (C, D, F y G) en el otro lado, conectadas por seis regiones de bucles conectadas. Estas regiones de bucles se denominan de acuerdo con las hebras beta conectadas a los extremos N y C de cada bucle. Por consiguiente, el bucle AB está situado entre las hebras beta A y B, el bucle BC está situado entre las hebras B y C, el bucle CD está situado entre las hebras beta C y D, el bucle DE está situado entre las hebras beta D y E, el bucle EF está situado entre las hebras beta E y F, y el bucle FG está situado entre las hebras beta F y G. Los dominios FnIII poseen bucles expuestos al disolvente que son tolerantes a la aleatorización, lo cual facilita la generación de diversas combinaciones de matrices de soporte proteicas capaces de unirse a dianas específicas con una afinidad alta.

En un aspecto de la invención, las subunidades monoméricas de Tn3 se someten a evolución dirigida diseñada para aleatorizar uno o más de los bucles que son análogos a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable de un anticuerpo. Tal técnica de evolución dirigida da como resultado la producción de moléculas similares a anticuerpos con afinidades altas por dianas de interés, p. ej., CD40L.

Además, en algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 descritas en la presente se pueden utilizar para presentar bucles expuestos definidos (por ejemplo, bucles aleatorizados previamente y seleccionados en función de la unión a la diana) con el fin de dirigir la evolución de moléculas que se unen a tales bucles introducidos. Este tipo de selección se puede llevar a cabo para identificar moléculas de reconocimiento para cualquier bucle similar a CDR individual o, como alternativa, para reconocer dos o los tres bucles similares a CDR combinados en un resto de unión al epítopo no lineal. Hay un grupo de tres bucles (denominados BC, DE y FG), que pueden conferir unión a dianas específicas, entre las hebras B y C; las hebras D y E, y las hebras beta F y G, respectivamente. Los bucles BC, DE y

5 FG del tercer dominio FnIII de la tenascina C humana tienen una longitud de 9, 6, y 10 residuos aminoacídicos, respectivamente. La longitud de estos bucles está comprendida en el rango estrecho de los bucles de reconocimiento de antígenos cognados que se encuentran en las cadenas pesadas de los anticuerpos, es decir, 7-10, 4-8, y 4-28 aminoácidos de longitud, respectivamente. De forma análoga, hay un segundo grupo de bucles, los bucles AB, CD y EF (7, 7 y 8 aminoácidos de longitud, respectivamente) entre las hebras beta A y B; las hebras beta C y D; y las hebras beta E y F, respectivamente.

10 Una vez aleatorizados y seleccionados para que tengan una unión de alta afinidad a una diana, los bucles en la matriz de soporte de Tn3 monomérica pueden establecer contactos con dianas que sean equivalentes a los contactos de los bucles CDR cognados en los anticuerpos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los bucles AB, CD y EF se aleatorizan y seleccionan para que tengan una unión de alta afinidad a una o más dianas, p. ej., CD40L. En algunas realizaciones, este proceso de aleatorización y selección se puede realizar en paralelo a la aleatorización de los bucles BC, DE, y FG, mientras que en otras realizaciones este proceso de aleatorización y selección se realiza en serie.

Subunidades monoméricas específicas para CD40L

15 La invención proporciona matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L recombinantes de origen no natural que comprenden una pluralidad de dominios de hebras beta unidos a una pluralidad de regiones de bucles, donde una o más de tales regiones de bucles varían en la delección, sustitución o adición de al menos un aminoácido respecto a los bucles cognados en la Tn3 natural (SEQ ID NO: 3) (remítase a la TABLA 1).

20 Para generar subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L con las características de unión novedosas, se somete la Tn3 original a adiciones, delecciones o sustituciones aminoacídicas. Se sobreentenderá que, cuando se compare la secuencia de una subunidad monomérica de Tn3 específica para CD40L con la secuencia de la Tn3 original, se utiliza la misma definición de las hebras beta y los bucles. En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la invención comprenden la secuencia de aminoácidos:

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT

donde:

25 (a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} y X_{FG} representan los residuos aminoacídicos presentes en las secuencias de los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente;

(b) X₁ representa un residuo aminoacídico de alanina (A) o treonina (T); y

(c) la longitud del bucle *n* es un número entero comprendido entre 2 y 26.

TABLA 2: Secuencias de los bucles de los clones de Tn3 utilizados en estos estudios

Clon	Bucle AB SEQ ID NO	Bucle BC SEQ ID NO	Bucle CD SEQ ID NO	Bucle DE SEQ ID NO	Bucle EF SEQ ID NO	Bucle FG SEQ ID NO*
Tn3 ORIGINAL						
Tn3	4	5	6	7	8	9
FAMILIA 309						
309FGwt			4	83	6	94
309			4	83	6	94
340			4	84	6	95
341			4	85	6	94
342			4	86	6	96
343			4	87	6	97
344			4	88	6	95
345			4	89	6	94
346			4	90	6	94
347			4	91	6	95
348			4	92	6	98
349			4	93	6	94
309FGwt consenso			4	168	6	169

Clon	Bucle AB SEQ ID NO	Bucle BC SEQ ID NO	Bucle CD SEQ ID NO	Bucle DE SEQ ID NO	Bucle EF SEQ ID NO	Bucle FG SEQ ID NO*
<i>Tn3 ORIGINAL</i>						
FAMILIA 311**						
311			4	100	6	118 8 129
311K4E			136	100	6	118 137 129
311K4E_1			136	101	6	119 8 129
311K4E_2			136	102	6	120 8 129
311K4E_3†			136	103	6	121 8 129
311K4E_4†			136	104	6	122 8 129
311K4E_5†			136	105	6	121 8 129
311K4E_7			136	106	6	123 8 129
311K4E_8†			136	107	6	123 8 129
311K4E_9			136	108	6	118 8 129
311K4E_10†			136	109	6	123 8 129
311K4E_11			136	110	6	121 8 129
311K4E_12†			136	111	6	123 8 130
311K4E_13			136	108	6	121 8 129
311K4E_14			136	112	6	124 8 129
311K4E_15			136	113	6	125 8 129
311K4E_16			136	114	6	118 8 129
311K4E_19			136	115	6	126 8 129
311K4E_20			136	116	6	127 8 129
311K4E_21			136	117	6	128 8 129
311 consenso			173	174	6	175 176 177
† Clones que comprenden una hebra beta C que tiene la secuencia CELAYGI (SEQ ID NO: 14), todos los demás clones comprenden una hebra beta C que tiene la secuencia CELTYGI (SEQ ID NO: 13).						
* En algunas variantes en la familia 309, p. ej., 342, el bucle FG se puede reemplazar por la SEQ ID NO: 139.						
** En algunas variantes en la familia 311, el bucle BC se puede modificar para reemplazar la tirosina en la posición 21. Se contempla específicamente que los residuos aminoacídicos de reemplazo puedan tener una cadena lateral pequeña.						

En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la invención consisten en la secuencia de aminoácidos:

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT

5 donde:

- (a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} y X_{FG} representan los residuos aminoacídicos presentes en las secuencias de los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente;
- (b) X₁ representa un residuo aminoacídico de alanina (A) o treonina (T); y
- (c) la longitud del bucle *n* es un número entero comprendido entre 2 y 26.

10 En una realización, las hebras beta de la matriz de soporte de Tn3 monomérica específica para CD40L tienen al menos un 90% de identidad secuencial respecto a las hebras beta de la matriz de soporte de Tn3 original (SEQ ID NO: 3). Para calcular tal porcentaje de identidad secuencial, las secuencias de aminoácidos se alinean aplicando métodos

conocidos en la técnica. El porcentaje de identidad secuencial se define como la relación entre (a) el número de aminoácidos situados en las hebras beta que son idénticos en el alineamiento de secuencias y (b) el número total de aminoácidos situados en las hebras beta.

5 En una realización, la secuencia del bucle AB comprende la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 136. En otra realización, la secuencia del bucle CD comprende la SEQ ID NO: 6. En otra realización, la secuencia del bucle EF comprende la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 137. En una realización, la secuencia del bucle AB consiste en la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 136. En otra realización, la secuencia del bucle CD consiste en la SEQ ID NO: 6. En otra realización, la secuencia del bucle EF consiste en la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 137.

10 En una realización, la secuencia del bucle BC comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 y 93. En otra realización, la secuencia del bucle BC consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 y 93.

En una realización, la secuencia del bucle DE comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 94, 95, 96, 97 y 98. En otra realización, la secuencia del bucle DE consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 94, 95, 96, 97 y 98.

15 En una realización, la secuencia del bucle FG comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 9, 99 y 139. En otra realización, la secuencia del bucle FG consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 9, 99 y 139.

20 En una realización, la secuencia del bucle BC comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 y 117. En otra realización, la secuencia del bucle BC consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 y 117.

25 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle DE comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 y 128. En otras realizaciones, la secuencia del bucle DE consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 y 128.

En algunas realizaciones, la secuencia del bucle FG comprende una secuencia seleccionada entre los grupos constituidos por las SEQ ID NOs: 129 y 130. En otras realizaciones, la secuencia del bucle FG consiste en una secuencia seleccionada entre los grupos constituidos por las SEQ ID NOs: 129 y 130.

30 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 83, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En algunas realizaciones, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 83, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 9 o 139.

35 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 83, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 99. En otras realizaciones, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 83, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 99.

40 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 84, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 95 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En otras realizaciones, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 84, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 95 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 9 o 139.

En algunas realizaciones, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 85, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En otras realizaciones, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 85, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 94 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 9 o 139.

45 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 86, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 96 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139. En otras realizaciones, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 86, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 96 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 9 o 139.

50 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 87, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 97 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139.

En otras realizaciones, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 87, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 97 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 9 o 139.

- 5 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle AB comprende la SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 115, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 126 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 129. En otras realizaciones, la secuencia del bucle AB consiste en la SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 115, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 126 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 129.
- 10 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle AB comprende la SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 116, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 127 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 129. En otras realizaciones, la secuencia del bucle AB consiste en la SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 116, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 127 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 129.
- 15 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle AB comprende la SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 117, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 128 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 129. En otras realizaciones, la secuencia del bucle AB consiste en la SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 117, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 128 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 129.
- 20 En algunas realizaciones, la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 174, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 175 y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 177. En otras realizaciones, la secuencia del bucle BC consiste en la SEQ ID NO: 174, la secuencia del bucle DE consiste en la SEQ ID NO: 175 y la secuencia del bucle FG consiste en la SEQ ID NO: 177.
- 25 En algunas realizaciones, la subunidad monomérica específica para CD40L comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 146. En otras realizaciones, la subunidad monomérica específica para CD40L consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 146.
- En algunas realizaciones, la subunidad monomérica específica para CD40L comprende la SEQ ID NO: 28 o 146. En otras realizaciones, la subunidad monomérica específica para CD40L consiste en la SEQ ID NO: 28 o 146.
- En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la invención comprenden la secuencia de aminoácidos:
- IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGIKDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDEYEVSLICRX₁₂GD
MSSNPAKETFTT (SEQ ID NO: 167)
- 30 donde:
- (a) X₁ representa un residuo aminoacídico de serina (S) o leucina (L);
- (b) X₂ representa un residuo aminoacídico de ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E);
- (c) X₃ representa un residuo aminoacídico de histidina (H), isoleucina (I), valina (V), fenilalanina (F) o triptófano (W);
- (d) X₄ representa un residuo aminoacídico de alanina (A), glicina (G), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);
- 35 (e) X₅ representa un residuo aminoacídico de ácido glutámico (E), leucina (L), glutamina (Q), serina (S), ácido aspártico (D) o asparagina (N);
- (f) X₆ representa un residuo aminoacídico de fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- (g) X₇ representa un residuo aminoacídico de isoleucina (I), valina (V), histidina (H), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);
- 40 (h) X₈ representa un residuo aminoacídico de glicina (G), triptófano (W) o valina (V);
- (i) X₉ representa un residuo aminoacídico de triptófano (W), fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- (j) X₁₀ representa un residuo aminoacídico de serina (S), glutamina (Q), metionina (M) o histidina (H);
- (k) X₁₁ representa un residuo aminoacídico de triptófano (W) o histidina (H); y
- (l) X₁₂ representa un residuo aminoacídico de arginina (R) o serina (S).
- 45 En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la invención consisten en la secuencia de aminoácidos:

IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGKIDVPGDRRTTDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDTTEYEVSLICRX₁₂GD
MSSNPAKETFTT (SEQ ID NO: 167)

donde:

- (a) X₁ representa un residuo aminoacídico de serina (S) o leucina (L);
- 5 (b) X₂ representa un residuo aminoacídico de ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E);
- (c) X₃ representa un residuo aminoacídico de histidina (H), isoleucina (I), valina (V), fenilalanina (F) o triptófano (W);
- (d) X₄ representa un residuo aminoacídico de alanina (A), glicina (G), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);
- (e) X₅ representa un residuo aminoacídico de ácido glutámico (E), leucina (L), glutamina (Q), serina (S), ácido aspártico (D) o asparagina (N);
- 10 (f) X₆ representa un residuo aminoacídico de fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- (g) X₇ representa un residuo aminoacídico de isoleucina (I), valina (V), histidina (H), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);
- (h) X₈ representa un residuo aminoacídico de glicina (G), triptófano (W) o valina (V);
- (i) X₉ representa un residuo aminoacídico de triptófano (W), fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- 15 (j) X₁₀ representa un residuo aminoacídico de serina (S), glutamina (Q), metionina (M) o histidina (H);
- (k) X₁₁ representa un residuo aminoacídico de triptófano (W) o histidina (H); y
- (l) X₁₂ representa un residuo aminoacídico de arginina (R) o serina (S).

En algunos aspectos, la subunidad monomérica específica para CD40L comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 y 82.
20 En algunos aspectos, la subunidad monomérica específica para CD40L consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEQ ID NOs: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 y 82.

En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la invención comprenden la secuencia de aminoácidos:

25 IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGKIDVPGDRRTTDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVS
LICTTDDGTGX₁₇NPAKETFTT (SEQ ID NO: 171)

donde:

- (a) X₁ representa un residuo aminoacídico de lisina (K) o ácido glutámico (E);
- (b) X₂ representa un residuo aminoacídico de treonina (T) o isoleucina (I);
- (c) X₃ representa un residuo aminoacídico de asparagina (N) o alanina (A);
- 30 (d) X₄ representa un residuo aminoacídico de serina (S), leucina (L), alanina (A), fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- (e) X₅ representa un residuo aminoacídico de tirosina (Y), alanina (A), glicina (G), valina (V), isoleucina (I) o serina (S);
- (f) X₆ representa un residuo aminoacídico de tirosina (Y), serina (S), alanina (A) o histidina (H);
- (g) X₇ representa un residuo aminoacídico de asparagina (N), ácido aspártico (D), histidina (H) o tirosina (Y);
- (h) X₈ representa un residuo aminoacídico de leucina (L), fenilalanina (F), histidina (H) o tirosina (Y);
- 35 (i) X₉ representa un residuo aminoacídico de histidina (H), prolina (P), serina (S), leucina (L) o ácido aspártico (D);
- (j) X₁₀ representa un residuo aminoacídico de glicina (G), fenilalanina (F), histidina (H) o tirosina (Y);
- (k) X₁₁ representa un residuo aminoacídico de alanina (A) o treonina (T);
- (l) X₁₂ representa un residuo aminoacídico de serina (S), asparagina (N), ácido glutámico (E), arginina (R) o ácido aspártico (D);

- (m) X₁₃ representa un residuo aminoacídico de serina (S), glutamina (Q), treonina (T), asparagina (N) o alanina (A);
- (n) X₁₄ representa un residuo aminoacídico de prolina (P), valina (V), isoleucina (I) o alanina (A) o ningún aminoácido;
- (o) X₁₅ representa un residuo aminoacídico de isoleucina (I) o ningún aminoácido;
- (p) X₁₆ representa un residuo aminoacídico de ácido glutámico (E) o lisina (K); y

5 (q) X₁₇ representa un residuo aminoacídico de serina (S) o asparagina (N).

En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la invención consisten en la secuencia de aminoácidos:

IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELEX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVS
LICLTDDGTYX₁₇NPAKETFTT (SEQ ID NO: 171)

10 donde:

(a) X₁ representa un residuo aminoacídico de lisina (K) o ácido glutámico (E);

(b) X₂ representa un residuo aminoacídico de treonina (T) o isoleucina (I);

(c) X₃ representa un residuo aminoacídico de asparagina (N) o alanina (A);

(d) X₄ representa un residuo aminoacídico de serina (S), leucina (L), alanina (A), fenilalanina (F) o tirosina (Y);

15 (e) X₅ representa un residuo aminoacídico de tirosina (Y), alanina (A), glicina (G), valina (V), isoleucina (I) o serina (S);

(f) X₆ representa un residuo aminoacídico de tirosina (Y), serina (S), alanina (A) o histidina (H);

(g) X₇ representa un residuo aminoacídico de asparagina (N), ácido aspártico (D), histidina (H) o tirosina (Y);

(h) X₈ representa un residuo aminoacídico de leucina (L), fenilalanina (F), histidina (H) o tirosina (Y);

(i) X₉ representa un residuo aminoacídico de histidina (H), prolina (P), serina (S), leucina (L) o ácido aspártico (D);

20 (j) X₁₀ representa un residuo aminoacídico de glicina (G), fenilalanina (F), histidina (H) o tirosina (Y);

(k) X₁₁ representa un residuo aminoacídico de alanina (A) o treonina (T);

(l) X₁₂ representa un residuo aminoacídico de serina (S), asparagina (N), ácido glutámico (E), arginina (R) o ácido aspártico (D);

(m) X₁₃ representa un residuo aminoacídico de serina (S), glutamina (Q), treonina (T), asparagina (N) o alanina (A);

25 (n) X₁₄ representa un residuo aminoacídico de prolina (P), valina (V), isoleucina (I) o alanina (A) o ningún aminoácido;

(o) X₁₅ representa un residuo aminoacídico de isoleucina (I) o ningún aminoácido;

(p) X₁₆ representa un residuo aminoacídico de ácido glutámico (E) o lisina (K); y

(q) X₁₇ representa un residuo aminoacídico de serina (S) o asparagina (N).

30 En algunas realizaciones, una matriz de soporte monomérica específica para CD40L comprende un módulo de Tn3 en el que una o más hebras beta comprenden al menos una sustitución aminoacídica salvo que los residuos de cisteína en las hebras beta C y F (SEQ ID NOs: 13 o 14; y la SEQ ID NO: 17, respectivamente) no se pueden sustituir.

Los bucles que conectan las diferentes hebras beta de una subunidad monomérica específica para CD40L se pueden aleatorizar en longitud y/o diversidad secuencial. En una realización, una subunidad monomérica específica para CD40L tiene al menos un bucle que está aleatorizado en longitud y/o diversidad secuencial. En una realización, al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles de una subunidad monomérica específica para CD40L están aleatorizados en longitud y/o diversidad secuencial. En una realización, al menos un bucle de una subunidad monomérica específica para CD40L se mantiene constante, mientras que al menos un bucle adicional está aleatorizado en longitud y/o diversidad secuencial. En otra realización, al menos uno, al menos dos o los tres bucles AB, CD y EF se mantienen constantes, mientras que al menos uno, al menos dos o los tres bucles BC, DE y FG están aleatorizados en longitud o diversidad secuencial. En otra realización, al menos uno, al menos dos o al menos los tres bucles AB, CD y EF están aleatorizados, mientras que al menos uno, al menos dos o los tres bucles BC, DE y FG están aleatorizados en longitud y/o diversidad secuencial. En otra realización más, al

menos uno, al menos dos, al menos tres de los bucles, al menos cuatro, al menos cinco o los seis bucles AB, CD, EF, BC, DE y FG están aleatorizados en longitud o diversidad secuencial.

5 En algunas realizaciones, uno o más residuos dentro de un bucle se mantienen constantes, mientras que los otros residuos están aleatorizados en longitud y/o diversidad secuencial. En algunas realizaciones, uno o más residuos dentro de un bucle se mantienen con un número limitado y predeterminado de aminoácidos diferentes, mientras que los otros residuos están aleatorizados en longitud y/o diversidad secuencial. Por consiguiente, una subunidad monomérica específica para CD40L de la invención puede comprender uno o más bucles que tengan una secuencia consenso degenerada y/o uno o más residuos aminoacídicos invariantes.

10 En una realización, la subunidad monomérica específica para CD40L de la invención comprende un bucle AB que está aleatorizado. En otra realización, la subunidad monomérica específica para CD40L de la invención comprende un bucle BC que está aleatorizado. En una realización, la subunidad monomérica específica para CD40L de la invención comprende un bucle CD que está aleatorizado. En una realización, la subunidad monomérica específica para CD40L de la invención comprende un bucle DE que está aleatorizado. En una realización, la subunidad monomérica específica para CD40L de la invención comprende un bucle EF que está aleatorizado.

15 En ciertas realizaciones, la subunidad monomérica específica para CD40L de la invención comprende un bucle FG que se mantiene de modo que tenga al menos un residuo aminoacídico menos que el bucle FG cognado del tercer dominio FnIII de la tenascina C humana y además está aleatorizado en una o más posiciones.

20 En realizaciones específicas, al menos uno de los bucles BC, DE y FG está aleatorizado, donde la hebra beta A comprende la SEQ ID NO:10 u 11, la hebra beta B comprende la SEQ ID NO:12, la hebra beta C comprende la SEQ ID NO:13 o 14, la hebra beta D comprende la SEQ ID NO:15, la hebra beta E comprende la SEQ ID NO:16, la hebra beta F comprende la SEQ ID NO:17 y la hebra beta G comprende la SEQ ID NO:18, el bucle AB comprende la SEQ ID NO:4 o 136, el bucle CD comprende la SEQ ID NO:6 y el bucle EF comprende la SEQ ID NO:8 o 137.

25 En otras realizaciones específicas, al menos uno de los bucles AB, CD y EF está aleatorizado, donde la hebra beta A comprende la SEQ ID NO:10 u 11, la hebra beta B comprende la SEQ ID NO:12, la hebra beta C comprende la SEQ ID NO:13 o 14, la hebra beta D comprende la SEQ ID NO:15, la hebra beta E comprende la SEQ ID NO:16, la hebra beta F comprende la SEQ ID NO:17 y la hebra beta G comprende la SEQ ID NO:18, el bucle BC comprende la SEQ ID NO:5, el bucle DE comprende la SEQ ID NO:7 y el bucle FG comprende la SEQ ID NO:9 o 139.

Aumento de la estabilidad de las matrices de soporte

30 La estabilidad de las matrices de soporte de Tn3 se puede incrementar mediante numerosos métodos diferentes. En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se estabilizan elongando las regiones amino- y/o carboxiterminal. Las regiones amino- y/o carboxiterminales se pueden elongar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 aminoácidos. En otras realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden estabilizar introduciendo una alteración que incremente la semivida sérica, tal como se ha descrito en la presente. En otra realización adicional, las matrices de soporte de Tn3 de la invención comprenden una adición, delección o sustitución de al menos un residuo aminoacídico para estabilizar el núcleo hidrófobo de la matriz de soporte.

35 Las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden estabilizar eficazmente creando enlaces disulfuro no naturales tal como se describe en la Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US2011/032184. En algunas realizaciones, las matrices de soporte de la invención comprenden enlaces disulfuro de origen no natural, tal como se describe en la Publicación de PCT N.º: WO 2009/058379. Se puede utilizar un método bioinformático para identificar posiciones candidatas adecuadas para crear enlaces disulfuro.

40 En una realización, una subunidad monomérica de Tn3 de la invención comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco enlaces disulfuro intramoleculares de origen no natural. En una realización, una subunidad monomérica de Tn3 de la invención comprende al menos un enlace disulfuro intramolecular de origen no natural, donde dicho enlace disulfuro de origen no natural estabiliza el monómero. En otra realización adicional, las matrices de soporte de Tn3 de la invención comprenden al menos un enlace disulfuro de origen no natural, donde el enlace está situado entre dos matrices de soporte de Tn3 monoméricas o multiméricas diferentes, es decir, el enlace disulfuro es un enlace disulfuro intermolecular. Por ejemplo, un enlace disulfuro puede unir matrices de soporte diferentes (por ejemplo, dos matrices de soporte monoméricas específicas para CD40L), una matriz de soporte de Tn3 y un conector, una matriz de soporte de Tn3 y un dominio Fc, o una matriz de soporte de Tn3 y un anticuerpo o un fragmento de este.

45 En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención comprenden al menos un enlace disulfuro intermolecular de origen no natural que une una subunidad monomérica de Tn3 y un resto heterólogo aislado, una subunidad monomérica de Tn3 y un resto heterólogo fusionado o conjugado con la misma matriz de soporte de Tn3, o una subunidad monomérica de Tn3 y un resto heterólogo fusionado o conjugado con una matriz de soporte de Tn3 diferente.

55

En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención comprenden un enlace disulfuro que forma una matriz de soporte de Tn3 multimérica constituida por al menos 2, al menos 3, al menos 4 o más subunidades monoméricas.

- 5 En otra realización, las matrices de soporte de Tn3 de la invención pueden comprender una elongación de las regiones aminoterminal y/o carboxiterminal. En una realización, la matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende una alteración para incrementar la semivida sérica, tal como se ha descrito en la presente. En otra realización adicional, las matrices de soporte de la invención comprenden una adición, delección o sustitución de al menos un residuo aminoacídico para estabilizar el núcleo hidrófobo de la matriz de soporte.

Mediciones de la estabilidad

- 10 La estabilidad de las subunidades monoméricas de Tn3 de la invención, aisladas o como parte de una matriz de soporte de Tn3 multimérica, se puede medir fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como la desnaturalización térmica (T_m) y caotrópica (tal como el tratamiento con sales de guanidina o urea), el tratamiento con proteasas (tal como el tratamiento con termolisina) u otra metodología aceptada en la técnica para determinar la estabilidad de una proteína. Se puede encontrar una revisión exhaustiva de técnicas empleadas para medir la estabilidad de una proteína, por ejemplo, en "Current Protocols in Molecular Biology" y "Current Protocols in Protein Science" de John Wiley and Sons. 2007.

Matrices de soporte de Tn3 multiméricas

- 20 Un aspecto de la presente invención proporciona matrices de soporte de Tn3 multiméricas que comprenden al menos dos subunidades monoméricas de Tn3 de la invención unidas en tándem y donde al menos uno de los monómeros es una subunidad monomérica específica para CD40L. Tales matrices de soporte de Tn3 multiméricas se pueden preparar en múltiples formatos. En un aspecto específico, la invención proporciona matrices de soporte de Tn3 multiméricas, donde al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L están conectadas en tándem a través de un conector peptídico. En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 multimérica exhibe un incremento en la valencia y/o la avidéz de unión a la diana u otra acción de la diana o las dianas. En algunas realizaciones, el incremento en la valencia y/o la avidéz de la unión a la diana se consigue al unir múltiples subunidades monoméricas a la misma diana. En algunas realizaciones, el incremento en la valencia mejora una acción específica sobre la diana, tal como el incremento de la dimerización de una proteína diana.

- 30 En una realización específica, una matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L conectadas en tándem, donde cada subunidad monomérica específica para CD40L se une al menos a una diana y donde cada subunidad monomérica específica para CD40L comprende una pluralidad de hebras beta unidas a una pluralidad de regiones de bucles, donde al menos un bucle es una variante de origen no natural del bucle cognado en la matriz de soporte de Tn3 original (SEQ ID NO: 3).

- 35 En una realización, las matrices de soporte de Tn3 multiméricas se generan mediante una unión covalente entre subunidades monoméricas específicas para CD40L, por ejemplo, mediante una unión directa de las subunidades monoméricas específicas para CD40L o mediante la inclusión de un conector, p. ej., un conector peptídico. En ejemplos particulares, las matrices de soporte de CD40L unidas covalentemente se generan construyendo genes de fusión que codifican las subunidades monoméricas específicas para CD40L o, como alternativa, creando codones para residuos de cisteína en las subunidades monoméricas específicas para CD40L y permitiendo que se formen enlaces disulfuro entre los productos de expresión.

- 40 En una realización, las matrices de soporte de Tn3 multiméricas de la invención comprenden al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L que están conectadas directamente entre sí sin ningún aminoácido interpuesto adicional. En otra realización, las matrices de soporte de Tn3 multiméricas de la invención comprenden al menos dos subunidades monoméricas específicas para Cd40L que están conectadas en tándem a través de un conector, p. ej., un conector peptídico.

- 45 En una realización específica, las matrices de soporte de Tn3 multiméricas de la invención comprenden al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L que están conectadas en tándem a través de un conector peptídico, donde el conector peptídico comprende de 1 a aproximadamente 1000, o de 1 aproximadamente 500, o de 1 aproximadamente 250, o de 1 aproximadamente 100, o de 1 aproximadamente 50, o de 1 aproximadamente 25 aminoácidos. En una realización específica, la matriz de soporte de Tn3 multimérica comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L que están conectadas en tándem a través de un conector peptídico, donde el conector peptídico comprende de 1 a aproximadamente 20, o de 1 aproximadamente 15, o de 1 aproximadamente 10, o de 1 aproximadamente 5 aminoácidos.

- 55 En una realización específica, la matriz de soporte de Tn3 multimérica comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L que están conectadas en tándem a través de un conector, p. ej., un conector peptídico, donde el conector es un resto funcional. El resto funcional se seleccionará en función de las características y/o la función deseadas de la matriz de soporte de Tn3 multimérica. Por ejemplo, se puede utilizar un resto funcional

útil para la purificación (p. ej., un marcador de histidina) como conector. Los restos funcionales útiles como conectores incluyen, sin carácter limitante, polietilenglicol (PEG), un agente citotóxico, un radionucleido, un contraste, biotina, un dominio de dimerización, albúmina sérica humana (HSA) o una de sus porciones de unión a FcRn, un dominio o fragmento de un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo de un dominio, un dominio de unión a albúmina, una molécula de IgG, una enzima, un ligando, un receptor, un péptido de unión, una matriz de soporte que no sea de Tn3, un epítipo marcador, un polímero polipeptídico recombinante, una citocina y similares. Los conectores peptídicos y restos funcionales específicos que se pueden utilizar como conectores se describen más adelante.

5

En realizaciones específicas, el resto funcional es una inmunoglobulina o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina o su fragmento comprende un dominio Fc. En algunas realizaciones, el dominio FcR no consigue inducir al menos una función efectora mediada por FcyR tal como ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). En la técnica hay constancia de que el dominio Fc se puede alterar para reducir o suprimir al menos una función efectora mediada por FcyR, remítase, por ejemplo, a las Pat. de EE. UU. N.ºs 5.624.821 y 6.737.056.

10

En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 multimérica comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L que están conectadas a través de uno o más conectores, donde los conectores interpuestos entre cada subunidad monomérica específica para CD40L pueden ser los mismos conectores o conectores diferentes. En algunas realizaciones, un conector puede comprender múltiples conectores, que pueden ser el mismo conector o conectores diferentes. En algunas realizaciones, cuando una pluralidad de conectores se concatenan, algunos o todos los conectores pueden ser restos funcionales.

15

Estequiometría de la unión de las matrices de soporte

20

En algunas realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica puede comprender una subunidad monomérica específica para CD40L para epítipos diferentes, que pueden ser epítipos diferentes en una única molécula de CD40L o en moléculas diana de CD40L diferentes. En algunas realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 multimérica puede comprender subunidades monoméricas específicas para CD40L donde cada subunidad tenga como diana uno o más epítipos diferentes en una o más moléculas de CD40L.

25

En otras realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica puede unirse a dos o más epítipos diferentes en la misma molécula de CD40L. En algunas realizaciones, los epítipos diferentes son epítipos no superpuestos. En otras realizaciones, los epítipos diferentes son epítipos superpuestos.

30

En otra realización adicional específica, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica se puede unir a uno o más epítipos en una molécula de CD40L y se puede unir además a uno o más epítipos en una segunda molécula de CD40L. En algunas realizaciones, las diferentes moléculas diana forman parte de un complejo oligomérico, p. ej., un complejo de CD40L trimérico.

35

En otra realización específica más, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica se puede unir a un único epítipo en un trímero de CD40L. En otra realización adicional, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica se puede unir al mismo epítipo en al menos dos trímeros de CD40L.

40

En ciertas realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica se puede unir al mismo epítipo en dos o más copias de una molécula de CD40L en una superficie celular adyacente. En ciertas realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica se puede unir al mismo epítipo en dos o más copias de una molécula de CD40L en solución. En algunas realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica se puede unir al mismo epítipo o a epítipos diferentes en CD40L con afinidades y/o avidedces de unión idénticas o diferentes.

45

En otra realización, una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica se puede unir a epítipos en una o más copias de CD40L y conseguir o incrementar (p. ej., sinérgicamente) una acción deseada sobre la diana, p. ej., prevenir la unión a un receptor o prevenir la oligomerización.

50

Además, cuando una matriz de soporte de Tn3 monomérica o multimérica de la invención comprende una pluralidad de subunidades monoméricas específicas para CD40L, p. ej., monómeros diferentes donde cada monómero tiene como diana epítipos diferentes en CD40L, tales subunidades monoméricas se pueden disponer de acuerdo con un patrón determinado o una orientación especial para conseguir o incrementar un efecto biológico determinado. Tales combinaciones de subunidades monoméricas se pueden organizar y evaluar subsecuentemente utilizando métodos conocidos en la técnica.

Fusiones

50

La invención proporciona matrices de soporte de Tn3 en las que al menos una subunidad monomérica específica para CD40L puede estar fusionada con un resto heterólogo. En este contexto, el resto heterólogo no se utiliza como espaciador para unir las matrices de soporte, sino que puede proporcionar funcionalidad adicional a la matriz de soporte de Tn3. En algunas realizaciones, un resto heterólogo también puede funcionar como conector. La presente invención abarca el uso de matrices de soporte de Tn3 conjugadas o fusionadas con uno o más restos heterólogos

que incluyen, sin carácter limitante, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas de bajo peso molecular, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. Por consiguiente, la invención proporciona polipéptidos que comprenden uno o más monómeros de Tn3 específicos para CD40L, que incluyen, sin carácter limitante, las proteínas de fusión que se describen en la presente.

La presente invención abarca el uso de matrices de soporte de Tn3 fusionadas recombinantemente o conjugadas químicamente con una proteína o un polipéptido heterólogos, o uno de sus fragmentos. La conjugación incluye tanto la conjugación covalente como no covalente. En algunas realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 se puede fusionar o conjugar químicamente con un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 500 o al menos 1000 aminoácidos para generar proteínas de fusión.

La fusión o conjugación de una matriz de soporte de Tn3 con uno o más restos heterólogos puede ser directa, es decir, sin un conector interpuesto entre una matriz de soporte de Tn3 y un resto heterólogo, o a través de una o más secuencias conectoras descritas en la presente. En algunas realizaciones, se pueden utilizar matrices de soporte para dirigir polipéptidos heterólogos a tipos de células particulares, ya sea *in vitro* o *in vivo*, mediante la fusión o conjugación de matrices de soporte de Tn3 con anticuerpos específicos para receptores de la superficie celular particulares en las células diana.

Las matrices de soporte de Tn3 fusionadas o conjugadas con polipéptidos heterólogos también se pueden utilizar en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación utilizando métodos conocidos en la técnica. Remítase, p. ej., a la Publicación Internacional N.º WO 93/21232; la Patente Europea N.º EP 439.095; Naramura *et al.*, Immunol. Lett. 39:91-99, 1994; la Pat. de EE. UU. N.º 5.474.981; Gillies *et al.*, PNAS 89:1428-1432, 1992; y Fell *et al.*, J. Immunol. 146:2446-2452, 1991.

En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 se pueden integrar en la respuesta inmunitaria humana mediante la fusión o conjugación de una matriz de soporte con una inmunoglobulina o un dominio de esta incluida, sin carácter limitante, la región constante de una IgG (Fc), p. ej., a través del extremo N o C. De forma análoga, se puede utilizar una fusión entre una matriz de soporte de Tn3 y una proteína de complemento, tal como Clq, para actuar sobre las células.

Varias publicaciones describen métodos para obtener moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (remítase, p. ej., a WO 97/43316; Pat. de EE. UU. N.º 5.869.046; Pat. de EE. UU. N.º 5.747.035; WO 96/32478; y WO 91/14438), fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión a FcRn se conservan pero las afinidades por otros receptores Fc se han reducido en gran medida (remítase, p. ej., a WO 99/43713) o fusionando las moléculas con dominios de unión a FcRn de anticuerpos (remítase, p. ej., a WO 00/09560; la Pat. de EE. UU. N.º 4.703.039). También se pueden encontrar técnicas y métodos específicos para incrementar la semivida de las moléculas fisiológicamente activas en la Patente de EE. UU. N.º 7.083.784. Específicamente, se contempla que las matrices de soporte de Tn3 se pueden fusionar a una región Fc de una IgG, donde la región Fc comprende las mutaciones en residuos aminoacídicos M252Y/S254T/T256E o H433K/N434F/Y436H, donde las posiciones aminoacídicas se designan de acuerdo con los esquemas de numeración de Kabat. Se contempla específicamente la fusión de una matriz de soporte de Tn3 con una variante del dominio Fc que no es capaz de inducir ADCC.

En algunas realizaciones, la semivida de la matriz de soporte de Tn3 se puede incrementar genéticamente mediante la fusión de la matriz de soporte de Tn3 con un polipéptido recombinante no estructurado intrínsecamente (p. ej., un polipéptido XTENT™) o mediante la conjugación con polietilenglicol (PEG).

En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 se puede fusionar con moléculas que incrementan o extienden la semivida sérica o *in vivo*. En algunas realizaciones, la matriz de soporte se puede fusionar o conjugar con albúmina, tal como albúmina sérica humana (HSA), uno de sus fragmentos de unión al receptor neonatal Fc (FcRn), PEG, polisacáridos, anticuerpos, complemento, hemoglobina, un péptido de unión, lipoproteínas y otros factores para incrementar su semivida en el torrente sanguíneo y/o su penetración tisular. Cualquiera de estas fusiones se puede generar mediante técnicas estándar, por ejemplo, mediante la expresión de la proteína de fusión a partir de un gen de fusión recombinante construido utilizando secuencias génicas de acceso público.

En algunas realizaciones, se puede mejorar una propiedad de la matriz de soporte de Tn3 mediante la conjugación o fusión con una variante de HSA, es decir, una molécula derivada de la HSA completa (SEQ ID NO: 139) que comprende al menos una sustitución aminoacídica, una delección o una truncación de la secuencia.

En algunas realizaciones, la propiedad mejorada mediante la conjugación con una variante de HSA es la semivida plasmática. La mejora en la semivida plasmática de la matriz de soporte de Tn3 puede ser una alteración en dicha propiedad tal como un incremento o una reducción de la semivida plasmática, o cambios en otros parámetros farmacocinéticos. En algunas realizaciones, la variante de HSA es un mutante derivado de la HSA completa (SEQ ID

5 NO: 138). En una realización específica, la variante de HSA comprende una sustitución de cisteína en la posición 34 por serina (SEQ ID NO: 133). Las variantes de HSA que se pueden utilizar para modificar la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 se describen, p. ej., en las Publicaciones Internacionales WO 2011/103076 y WO 2011/051489. En algunas realizaciones, la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 de la invención se incrementa fusionándola con una variante de HSA que comprende al menos una sustitución aminoacídica en el dominio III de la HSA.

10 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende una variante de HSA que comprende la secuencia de la HSA madura completa (SEQ ID NO: 138) o un fragmento de esta, salvo por al menos una sustitución aminoacídica, numerada respecto a la posición en la HSA madura completa, en una posición seleccionada entre el grupo constituido por 407, 415, 463, 500, 506, 508, 509, 511, 512, 515, 516, 521, 523, 524, 526, 535, 550, 557, 573, 574 y 580; donde la sustitución aminoacídica no comprende sustituir una lisina (K) por ácido glutámico (E) en la posición 573, y donde la matriz de soporte de Tn3 tiene una semivida plasmática más prolongada que la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 que no está conjugada con la variante de HSA.

15 En algunas realizaciones diferentes, al menos una sustitución aminoacídica, numerada respecto a la posición en la HSA madura completa, se encuentra en una posición seleccionada entre el grupo constituido por 463, 508, 523 y 524, donde la matriz de soporte de Tn3 tiene una semivida plasmática más prolongada que la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 que no está conjugada con la variante de HSA.

20 En otras realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende una variante de HSA que comprende la secuencia de la HSA madura completa (SEQ ID NO: 133 o 138) o un fragmento de esta, salvo por al menos una sustitución aminoacídica, numerada respecto a la posición en la HSA madura completa, seleccionada entre el grupo constituido por:

- (a) sustitución de leucina (L) en la posición 407 por asparagina (N) o tirosina (Y);
- (b) sustitución de valina (V) en la posición 415 por treonina (T);
- (c) sustitución de leucina (L) en la posición 463 por asparagina (N);
- 25 (d) sustitución de lisina (K) en la posición 500 por arginina (R);
- (e) sustitución de treonina (T) en la posición 506 por tirosina (Y);
- (f) sustitución de treonina (T) en la posición 508 por arginina (R);
- (g) sustitución de fenilalanina (F) en la posición 509 por metionina (M) o triptófano (W);
- (h) sustitución de alanina (A) en la posición 511 por fenilalanina (F);
- 30 (i) sustitución de ácido aspártico (T) en la posición 512 por tirosina (Y);
- (j) sustitución de treonina (T) en la posición 515 por glutamina (Q);
- (k) sustitución de leucina (L) en la posición 516 por treonina (T) o triptófano (W);
- (l) sustitución de arginina (R) en la posición 521 por triptófano (W);
- 35 (m) sustitución de isoleucina (I) en la posición 523 por ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), lisina (K) o arginina (R);
- (n) sustitución de lisina (K) en la posición 524 por leucina (L);
- (o) sustitución de glutamina (Q) en la posición 526 por metionina (M);
- (p) sustitución de histidina (H) en la posición 535 por prolina (P);
- (q) sustitución de ácido aspártico (T) en la posición 550 por ácido glutámico (E);
- 40 (r) sustitución de lisina (K) en la posición 557 por glicina (G);
- (s) sustitución de lisina (K) en la posición 573 por fenilalanina (F), histidina (H), prolina (P), triptófano (W) o tirosina (Y);
- (t) sustitución de lisina (K) en la posición 574 por asparagina (N);
- (u) sustitución de glutamina (Q) en la posición 580 por lisina (K); y

(v) una combinación de dos o más de estas sustituciones,

donde dicha matriz de soporte de Tn3 tiene una semivida plasmática más prolongada que la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 no conjugada con dicha variante de HSA.

5 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 comprende una variante de HSA que comprende la secuencia de la HSA madura completa (SEQ ID NO: 133 o 138) o un fragmento de esta, salvo por al menos una sustitución aminoacídica, numerada respecto a la posición en la HSA madura completa, seleccionada entre el grupo constituido por:

(a) sustitución de leucina (L) en la posición 463 por asparagina (N);

(b) sustitución de treonina (T) en la posición 508 por arginina (R);

10 (c) sustitución de isoleucina (I) en la posición 523 por ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), lisina (K) o arginina (R);

(d) sustitución de lisina (K) en la posición 524 por leucina (L); y

(e) una combinación de dos o más de estas sustituciones,

15 donde dicha matriz de soporte de Tn3 tiene una semivida plasmática más prolongada que la semivida plasmática de una matriz de soporte de Tn3 no conjugada con dicha variante de HSA.

Es más, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido polihistidínico (marcador His), p. ej., un marcador de octahistidina (marcador His-8) o marcador de hexahistidina (marcador His-6) tal como el marcador proporcionado en un vector de expresión pQE (QIAGEN, Inc., 20 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif, 91311), entre otros vectores, muchos de los cuales se comercializan. Tal como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86:821-824, 1989, por ejemplo, la polihistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, sin carácter limitante, un marcador de hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína 25 hemaglutinina de la gripe (remítase, p. ej., a Wilson *et al.*, Cell 37:767, 1984), un marcador FLAG, un marcador de estreptavidina, un marcador myc, un marcador V5, un marcador GFP, un marcador AU1, un marcador AU5, un marcador ECS, un marcador GST o un marcador OLLAS.

Se pueden generar otras proteínas de fusión que comprenden matrices de soporte de Tn3 de la invención mediante técnicas de transposición genética, transposición de motivos, transposición de exones y/o transposición de codones (denominados colectivamente "transposición de ADN").

30 La transposición de ADN se puede emplear para alterar la acción de las matrices de soporte de Tn3 sobre la diana (p. ej., generar matrices de soporte con afinidades superiores y velocidades de disociación inferiores). Las matrices de soporte de Tn3 se pueden alterar mediante mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos al azar u otros métodos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica una matriz de soporte, que se une a una diana específica se puede recombinar con uno o más componentes, motivos, 35 secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Fusiones con dominios Fc y anticuerpos

En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende una subunidad monomérica específica para CD40L fusionada con un dominio o fragmento de un anticuerpo (p. ej., una IgG), incluido, sin carácter limitante, un dominio Fc.

40 En algunas realizaciones, solamente una subunidad monomérica específica para CD40L se conjuga o fusiona con un dominio o fragmento de un anticuerpo. Por ejemplo, una única subunidad monomérica específica para CD40L se puede fusionar con el extremo N de un polipéptido de un dominio o fragmento de un anticuerpo (p. ej., una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo). En otras realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 se crean fusionando o conjugado una o más subunidades monoméricas específicas para CD40L con el extremo N y/o el extremo 45 C de un polipéptido de un dominio o fragmento de un anticuerpo (p. ej., una cadena pesada y/o una cadena ligera de un anticuerpo o un dominio Fc).

En algunas realizaciones, algunas o todas las subunidades monoméricas específicas para CD40L fusionadas con un dominio o fragmento de un anticuerpo son idénticas.

50 En algunas realizaciones diferentes, algunas o todas las subunidades monoméricas específicas para CD40L fusionadas con un dominio o fragmento de un anticuerpo son diferentes.

En una realización específica, la matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende una subunidad monomérica específica para CD40L fusionada con un dominio Fc. En otras realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende al menos dos subunidades monoméricas específicas para CD40L fusionadas con un dominio Fc. En una realización específica, dos de las subunidades monoméricas específicas para CD40L fusionadas con un dominio Fc son idénticas. En una realización específica, dos de las subunidades monoméricas específicas para CD40L fusionadas con un dominio Fc son diferentes. En una realización específica, dos subunidades monoméricas específicas para CD40L fusionadas con un dominio Fc están conectadas entre sí en tándem y una de las subunidades monoméricas específicas para CD40L está fusionada con un dominio Fc.

En algunas realizaciones, se pueden dimerizar diferentes matrices de soporte de Tn3 de la invención utilizando mutaciones del dominio Fc que favorezcan la formación de heterodímeros. En la técnica se sabe que las variantes de la región Fc (p. ej., sustituciones y/o adiciones y/o deleciones aminoacídicas) incrementan o reducen la función efectora del anticuerpo y pueden alterar las propiedades farmacocinéticas (p. ej., la semivida) del anticuerpo. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención comprenden uno o más dominios Fc que comprenden una región Fc alterada en los que se han realizado una o más alteraciones en la región Fc con el fin de modificar las propiedades funcionales y/o farmacocinéticas de la matriz de soporte de Tn3. En ciertas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención comprenden uno o más dominios Fc que comprenden una región Fc alterada en los que se han realizado una o más alteraciones en la región Fc con el fin de reducir o suprimir al menos una función efectora mediada por FcR.

También se sabe que la glicosilación de la región Fc se puede modificar para incrementar o reducir la función efectora y/o la actividad antiinflamatoria. Por consiguiente, en una realización, una matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende una región Fc con glicosilación alterada de los residuos aminoacídicos para modificar las propiedades citotóxicas y/o antiinflamatorias de las matrices de soporte de Tn3.

Topologías de las matrices de soporte de Tn3

Las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden fusionar con el extremo C de los dominios Fc, cadenas ligeras de anticuerpos y cadenas pesadas de anticuerpos en cualquier disposición espacial adecuada. Remítase, p. ej., a la Publicación Internacional PCT/US2011/032184 para consultar una descripción detallada de las topologías de las matrices de soporte contempladas.

Generación de las matrices de soporte de la invención

Las matrices de soporte de Tn3 que se describen en la presente se pueden utilizar en cualquier técnica para desarrollar proteínas de unión a una diana nuevas o mejoradas. En un ejemplo particular, la diana está inmovilizada en un soporte sólido, tal como una resina en una columna o un pocillo de una placa de microtitulación, y la diana se pone en contacto con una colección de proteínas de unión basadas en matrices de soporte candidatas. Dicha colección puede consistir en clones construidos a partir de una matriz de soporte de Tn3, mediante aleatorización de la secuencia y/o la longitud de los bucles similares a CDR.

A este respecto, la expresión en bacteriófagos (fagos) es una técnica muy conocida que permite cribar colecciones de oligopéptidos extensas para identificar uno o más miembros de tales colecciones que sean capaces de unirse específicamente a una diana. La expresión en fagos es una técnica mediante la cual se expresan variantes polipeptídicas como proteínas de fusión con la proteína capsídica en la superficie de partículas bacteriófagas (Scott, J. K. y Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). Se puede emplear un método bioinformático para determinar las preferencias en cuanto a la longitud y la diversidad de los bucles de los dominios FNIII de origen natural. Utilizando este análisis, las preferencias en cuanto a la longitud y la diversidad secuencial de los bucles se puede emplear para elaborar un método de "aleatorización restringida". En esta aleatorización restringida, las preferencias relativas en cuanto a la longitud y la secuencia de los bucles se incorporan en el desarrollo de una estrategia en la que utiliza una colección. La integración del análisis de la longitud y la diversidad secuencial de los bucles en el desarrollo de una colección da como resultado una aleatorización restringida (es decir, ciertas posiciones dentro del bucle aleatorizado se limitan en lo que respecta al aminoácido que puede encontrarse en esa posición).

La invención también proporciona colecciones recombinantes que comprenden diversas poblaciones de matrices de soporte de Tn3 de origen no natural. En una realización, las colecciones comprenden matrices de soporte de Tn3 de origen no natural que comprenden una pluralidad de dominios de hebras beta unidos a una pluralidad de regiones de bucles, donde uno o más de dichos bucles varían en la deleción, sustitución o adición de al menos un aminoácido. En una realización específica, las colecciones comprenden matrices de soporte de Tn3 derivadas de la matriz de soporte de Tn3 natural.

Tal como se ha indicado anteriormente, los bucles que conectan las diferentes hebras beta de las matrices de soporte se pueden aleatorizar en longitud y/o diversidad secuencial. En una realización, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de Tn3 que contienen al menos un bucle que está aleatorizado en longitud y/o diversidad secuencial. En una realización, al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco

o al menos seis bucles de las matrices de soporte de Tn3 están aleatorizados en longitud y/o diversidad secuencial. En una realización, al menos un bucle se mantiene constante, mientras que al menos un bucle adicional está aleatorizado en longitud y/o diversidad secuencial. En otra realización, al menos uno, al menos dos o los tres bucles AB, CD y EF se mantienen constantes, mientras que al menos uno, al menos dos o los tres bucles BC, DE y FG están aleatorizados en longitud o diversidad secuencial. En otra realización, al menos uno, al menos dos o al menos los tres bucles AB, CD y EF están aleatorizados, mientras que al menos uno, al menos dos o los tres bucles BC, DE y FG están aleatorizados en longitud y/o diversidad secuencial.

En una realización específica, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de FnIII, donde la hebra beta A comprende la SEQ ID NO: 10 u 11, la hebra beta B comprende la SEQ ID NO: 12, la hebra beta C comprende la SEQ ID NO: 13 o 14, la hebra beta D comprende la SEQ ID NO: 15, la hebra beta E comprende la SEQ ID NO: 16, la hebra beta F comprende la SEQ ID NO: 17, y la hebra beta G comprende la SEQ ID NO: 18.

En una realización específica, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de FnIII, donde la hebra beta A consiste en la SEQ ID NO: 10 u 11, la hebra beta B consiste en la SEQ ID NO: 12, la hebra beta C consiste en la SEQ ID NO: 13 o 14, la hebra beta D consiste en la SEQ ID NO: 15, la hebra beta E consiste en la SEQ ID NO: 16, la hebra beta F consiste en la SEQ ID NO: 17, y la hebra beta G consiste en la SEQ ID NO: 18.

En una realización específica, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de FnIII, donde la hebra beta A consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 10 u 11, la hebra beta B consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 12, la hebra beta C consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 13 o 14, la hebra beta D consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 15, la hebra beta E consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 16, la hebra beta F consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 17, y la hebra beta G consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 18.

Tal como se ha indicado anteriormente, uno o más residuos dentro de un bucle se pueden mantener constantes, mientras que otros residuos están aleatorizados en longitud y/o diversidad secuencial. Opcionalmente o como alternativa, uno o más residuos dentro de un bucle se pueden mantener hasta un número predeterminado y limitado de aminoácidos diferentes, mientras que otros residuos están aleatorizados en longitud y/o diversidad secuencial. Por consiguiente, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de Tn3 que pueden comprender uno o más bucles que tengan una secuencia consenso degenerada y/o uno o más residuos aminoacídicos invariantes. En otra realización, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de Tn3 que contienen bucles BC que están aleatorizados. En otra realización, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de Tn3 que contienen bucles BC que están aleatorizados. En otra realización más, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de Tn3 que contienen bucles BC que están aleatorizados.

En una realización, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de Tn3 que contienen bucles DE que están aleatorizados. En una realización, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de Tn3 que contienen bucles FG que están aleatorizados. En otra realización, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte de FnIII que contienen bucles FG que están aleatorizados.

En una realización específica, las colecciones de la invención comprenden matrices de soporte, donde las matrices de soporte comprenden la secuencia de aminoácidos:

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT

donde:

(a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} y X_{FG} representan los residuos aminoacídicos presentes en las secuencias de los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente;

(b) X₁ representa un residuo aminoacídico de A o T; y

(c) la longitud del bucle *n* es un número entero comprendido entre 2 y 26.

En algunas realizaciones, las colecciones de la invención comprenden subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la invención que comprenden la secuencia de aminoácidos:

IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGKIDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDEYEVSLICRX₁₂GD
MSSNPAKETFTT (SEQ ID NO: 167)

donde:

(a) X₁ representa un residuo aminoacídico de serina (S) o leucina (L);

(b) X₂ representa un residuo aminoacídico de ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E);

(c) X₃ representa un residuo aminoacídico de histidina (H), isoleucina (I), valina (V), fenilalanina (F) o triptófano (W);

ES 2 819 075 T3

- (d) X₄ representa un residuo aminoacídico de alanina (A), glicina (G), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);
- (e) X₅ representa un residuo aminoacídico de ácido glutámico (E), leucina (L), glutamina (Q), serina (S), ácido aspártico (D) o asparagina (N);
- (f) X₆ representa un residuo aminoacídico de fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- 5 (g) X₇ representa un residuo aminoacídico de isoleucina (I), valina (V), histidina (H), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);
- (h) X₈ representa un residuo aminoacídico de glicina (G), triptófano (W) o valina (V);
- (i) X₉ representa un residuo aminoacídico de triptófano (W), fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- (j) X₁₀ representa un residuo aminoacídico de serina (S), glutamina (Q), metionina (M) o histidina (H);
- 10 (k) X₁₁ representa un residuo aminoacídico de triptófano (W) o histidina (H); y
- (l) X₁₂ representa un residuo aminoacídico de arginina (R) o serina (S).

En algunas realizaciones, las colecciones de la invención comprenden subunidades monoméricas de Tn3 específicas para CD40L de la invención que comprenden la secuencia de aminoácidos:

15 IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVS
LICLTTDGTXX₁₇NPAKETFTT (SEQ ID NO: 171)

donde:

- (a) X₁ representa un residuo aminoacídico de lisina (K) o ácido glutámico (E);
- (b) X₂ representa un residuo aminoacídico de treonina (T) o isoleucina (I);
- (c) X₃ representa un residuo aminoacídico de asparagina (N) o alanina (A);
- 20 (d) X₄ representa un residuo aminoacídico de serina (S), leucina (L), alanina (A), fenilalanina (F) o tirosina (Y);
- (e) X₅ representa un residuo aminoacídico de tirosina (Y), alanina (A), glicina (G), valina (V), isoleucina (I) o serina (S);
- (f) X₆ representa un residuo aminoacídico de tirosina (Y), serina (S), alanina (A) o histidina (H);
- (g) X₇ representa un residuo aminoacídico de asparagina (N), ácido aspártico (D), histidina (H) o tirosina (Y);
- (h) X₈ representa un residuo aminoacídico de leucina (L), fenilalanina (F), histidina (H) o tirosina (Y);
- 25 (i) X₉ representa un residuo aminoacídico de histidina (H), prolina (P), serina (S), leucina (L) o ácido aspártico (D);
- (j) X₁₀ representa un residuo aminoacídico de glicina (G), fenilalanina (F), histidina (H) o tirosina (Y);
- (k) X₁₁ representa un residuo aminoacídico de alanina (A) o treonina (T);
- (l) X₁₂ representa un residuo aminoacídico de serina (S), asparagina (N), ácido glutámico (E), arginina (R) o ácido aspártico (D);
- 30 (m) X₁₃ representa un residuo aminoacídico de serina (S), glutamina (Q), treonina (T), asparagina (N) o alanina (A);
- (n) X₁₄ representa un residuo aminoacídico de prolina (P), valina (V), isoleucina (I) o alanina (A) o ningún aminoácido;
- (o) X₁₅ representa un residuo aminoacídico de isoleucina (I) o ningún aminoácido;
- (p) X₁₆ representa un residuo aminoacídico de ácido glutámico (E) o lisina (K); y
- (q) X₁₇ representa un residuo aminoacídico de serina (S) o asparagina (N).
- 35 La invención también comprende métodos para identificar una matriz de soporte de Tn3 recombinante que se una a una diana, p. ej., CD40L, y que tenga una mayor estabilidad o acción mejorada sobre la diana, p. ej., CD40L, en comparación con una matriz de soporte de Tn3 original cribando las colecciones de la invención.

En ciertas realizaciones, el método para identificar una matriz de soporte de Tn3 recombinante que tenga una mayor estabilidad proteica en comparación con una matriz de soporte de Tn3 original y que se una específicamente a una diana comprende:

5 poner en contacto el ligando diana con una colección de la invención en condiciones adecuadas para formar un complejo de matriz de soporte:ligando diana;

obtener a partir del complejo, la matriz de soporte que se une al ligando diana;

determinar si la estabilidad de la matriz de soporte obtenida en el paso (b) es superior a la de la matriz de soporte de Tn3 natural.

10 Se puede utilizar el mismo método para identificar una matriz de soporte de Tn3 recombinante con una afinidad, avidez de unión mejoradas, etc. a la diana. En una realización, en el paso (a) se incuba la colección de matrices de soporte de la invención con una diana inmovilizada. En una realización, en el paso (b) se lava el complejo de matriz de soporte:ligando diana para eliminar los ligantes no específicos y los ligantes unidos más estrechamente se eluyen en condiciones muy rigurosas, y se realiza una PCR para recuperar la información sobre la secuencia. Se contempla específicamente que los ligantes y/o la información sobre la secuencia obtenida en el paso (b) se pueden utilizar para
15 crear una nueva colección utilizando los métodos que se describen en la presente o con los que estará familiarizado un experto en la técnica, que se pueden utilizar para repetir el proceso de selección, con o sin mutagénesis posterior de la secuencia. En algunas realizaciones, se pueden realizar varias rondas de selección hasta obtener ligantes con suficiente afinidad por el antígeno.

20 Una realización adicional de la invención es un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos aislados que codifican una colección que comprende las matrices de soporte de la invención y que es como se ha descrito anteriormente.

25 Las matrices de soporte de la invención se pueden someter a maduración de la afinidad. En este proceso aceptado en la técnica, una proteína de unión específica se somete a un esquema que selecciona en función del incremento de la afinidad por una diana específica (remítase a Wu *et al.*, *Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 95(11):6037-42). Las matrices de soporte resultantes de la invención pueden exhibir características de unión al menos equiparables a las de las matrices de soporte antes de la maduración de la afinidad al compararlas.

30 La descripción también proporciona métodos para identificar la secuencia de aminoácidos de una matriz de soporte proteica capaz de unirse a una diana para formar así un complejo de matriz de soporte:diana. En una realización, el método comprende: (a) poner en contacto una colección de la invención con una diana inmovilizada o separable; (b) separar los complejos de matriz de soporte:diana de las matrices de soporte libres; (c) provocar la replicación de las matrices de soporte separadas de (b) para obtener así una nueva colección de expresión de polipéptidos que se diferencia de la de (a) en que tiene una menor diversidad y en que está enriquecida en matrices de soporte expresadas capaces de unirse a la diana; (d) repetir opcionalmente los pasos (a) y (b) con la nueva colección de (c); y (e) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica la matriz de soporte expresada de una especie de (d) y, por lo tanto, deducir la secuencia peptídica capaz de unirse a la diana.

35 En otra realización, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden aleatorizar adicionalmente tras su identificación mediante la criba de la colección. En una realización, los métodos de la invención comprenden además aleatorizar al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles de una matriz de soporte identificada a partir de una colección utilizando un método descrito en la presente. En otra
40 realización, la matriz de soporte adicionalmente aleatorizada se somete a un método subsecuente para identificar una matriz de soporte capaz de unirse a una diana. Este método comprende (a) poner en contacto dicha matriz de soporte adicionalmente aleatorizada con una diana inmovilizada o separable, (b) separar los complejos de matriz de soporte adicionalmente aleatorizada:diana de las matrices de soporte libres, (c) provocar la replicación de las matrices de soporte separadas de (b), opcionalmente repetir los pasos (a)-(c) y (d) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica dicha matriz de soporte adicionalmente aleatorizada y, por lo tanto, deducir la secuencia
45 peptídica capaz de unirse a la diana.

50 En otra realización, las matrices de soporte adicionalmente aleatorizadas comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles aleatorizados que se habían aleatorizado previamente en la primera colección. En una realización alternativa adicional, las matrices de soporte adicionalmente aleatorizadas comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles aleatorizados que previamente no se habían aleatorizado en la primera colección.

55 La descripción también proporciona un método para obtener al menos dos matrices de soporte de Tn3 que se unan a al menos una o más dianas. Este método permite cribar los agentes que actúan cooperativamente para obtener una respuesta particular. Puede ser conveniente utilizar este tipo de criba cuando se necesite una actividad agonista que requiera la cooperación de más de una matriz de soporte. Este método permite cribar agentes cooperantes sin reformatear la colección para formar complejos multiméricos. En una realización, el método de la invención comprende poner en contacto un ligando diana con una colección de la invención en condiciones que permitan que se forme un complejo de matriz de soporte:ligando

diana, conectar dichas matrices de soporte con un agente reticulante (definido como un agente que junta, en proximidad cercana, al menos dos matrices de soporte idénticas o diferentes) donde la reticulación de las matrices de soporte produce una respuesta detectable y obtener a partir del complejo dichas matrices de soporte que se unen a la diana. En una realización adicional, el agente reticulante es un anticuerpo específico para la matriz de soporte o un fragmento de este, un anticuerpo específico para un epítopo marcador o un fragmento de este, un dominio de dimerización, tal como una región Fc, un motivo de hélice superenrollada (por ejemplo, sin carácter limitante, una cremallera de leucina), un reticulante químico u otro dominio de dimerización conocido en la técnica.

La descripción también proporciona métodos para detectar un compuesto utilizando las matrices de soporte de Tn3 de la invención. Basándose en las especificidades de unión de las matrices de soporte de Tn3 obtenidas mediante la criba de la colección, es posible utilizar tales matrices de soporte de Tn3 en ensayos para detectar la diana específica en una muestra, tales como para métodos de diagnóstico. En una realización, el método para detectar un compuesto comprende poner en contacto dicho compuesto en una muestra con una matriz de soporte de Tn3 de la invención en condiciones que permitan que se forme un complejo de compuesto:matriz de soporte y detectar dicha matriz de soporte, y de este modo se detecta dicho compuesto en una muestra. En realizaciones adicionales, la matriz de soporte se marca (es decir, con un radiomarcador, marcador fluorescente, con actividad enzimática o colorimétrico) para facilitar la detección del compuesto.

La descripción también proporciona métodos para capturar un compuesto utilizando las matrices de soporte de Tn3 de la invención. Basándose en las especificidades de unión de las matrices de soporte de Tn3 obtenidas mediante la criba de la colección, es posible utilizar tales matrices de soporte de Tn3 en ensayos para capturar la diana específica en una muestra, tales como para métodos de purificación. En una realización, el método para capturar un compuesto en una muestra comprende poner en contacto dicho compuesto en una muestra con una matriz de soporte de la invención en condiciones que permitan la formación de un complejo de compuesto:matriz de soporte y separar dicho complejo de la muestra, y de este modo se captura dicho compuesto en dicha muestra. En realizaciones adicionales, la matriz de soporte de Tn3 se inmoviliza para facilitar la separación del complejo de compuesto:matriz de soporte.

En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 aisladas de las colecciones de la invención comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más bucles aleatorizados. En algunas realizaciones, las secuencias de los bucles de las matrices de soporte de Tn3 aisladas se pueden intercambiar de una matriz de soporte donante a cualquier bucle en una matriz de soporte de FnIII receptora incluidas, sin carácter limitante, una matriz de soporte de Tn3 receptora (por ejemplo, una secuencia del bucle FG de una matriz de soporte donante se puede transferir a cualquier bucle en una matriz de soporte de FnIII receptora). En realizaciones específicas, las secuencias de los bucles aisladas se pueden transferir al bucle cognado en la matriz de soporte receptora (por ejemplo, una secuencia del bucle FG de una matriz de soporte donante se puede transferir a una matriz de soporte de FnIII receptora en la posición del bucle FG). En algunas realizaciones, las secuencias de los bucles aisladas se pueden "mezclar y combinar" al azar con varias matrices de soporte receptoras.

En otras realizaciones, las secuencias de las matrices de soporte de Tn3 aisladas se pueden identificar por la secuencia de los bucles. Por ejemplo, se utiliza una colección para la adsorción a una diana particular y se aísla una colección de ligantes específicos. Las secuencias de los bucles aleatorizados se pueden caracterizar como secuencias específicas independientemente del contexto de la matriz de soporte de Tn3 (es decir, la matriz de soporte que se une a una diana X donde dicha matriz de soporte comprende una secuencia del bucle FG de la SEQ ID NO:X). En realizaciones alternativas, cuando una matriz de soporte exhibe dos secuencias de bucles que se unen a la diana X, las secuencias de los bucles se pueden caracterizar como las que se unen a la diana X en ausencia de la secuencia de las matrices de soporte. Es decir, se contempla que las matrices de soporte aisladas de una colección que se unen a una diana particular se puedan expresar como las secuencias de bucles variables que se unen a dicha diana independientemente del contexto de la matriz de soporte. Este proceso sería análogo al concepto de las CDR en las regiones variables de anticuerpos.

Maduración de la afinidad

El desarrollo de las matrices de soporte de Tn3 de la invención puede implicar uno o más pasos de maduración de la afinidad *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas de Tn3 pueden someterse a un único paso de maduración de la afinidad. En otras realizaciones, las subunidades monoméricas de Tn3 se pueden someter a dos o más pasos de maduración de la afinidad. Se puede emplear cualquier estrategia de maduración de la afinidad que produzca, en general, cambios aminoacídicos en una matriz de soporte de Tn3 original o específicamente cambios aminoacídicos en los bucles de una matriz de soporte de Tn3 original que mejoran la unión de la matriz de soporte de Tn3 con afinidad madura al antígeno deseado.

Estos cambios aminoacídicos se pueden conseguir, por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria, mutagénesis "walk through" y mutagénesis "look through". Tales mutagénesis se pueden conseguir, por ejemplo, mediante PCR propensa a errores, cepas "mutadoras" de levaduras o bacterias, la incorporación de cambios de ácidos nucleicos aleatorios o definidos durante la síntesis *ab initio* de toda o parte de una molécula de unión basada en FnIII. Los métodos para llevar a cabo la maduración de la afinidad y/o mutagénesis se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE. UU. N.ºs

7.195.880; 6.951.725; 7.078.197; 7.022.479; 5.922.545; 5.830.721; 5.605.793; 5.830.650; 6.194.550; 6.699.658; 7.063.943; 5.866.344 y la Publicación de PCT WO06023144.

5 Tales métodos de maduración de la afinidad pueden requerir además que se incremente la rigurosidad del ensayo de criba de la unión al antígeno para seleccionar las matrices de soporte de Tn3 con afinidad mejorada por un antígeno. Los métodos reconocidos en la técnica para incrementar la rigurosidad de un ensayo de interacción proteína-proteína se pueden utilizar en la presente. En una realización, se varían una o más de las condiciones del ensayo (por ejemplo, la salinidad del tampón de ensayo) para reducir la afinidad de la matriz de soporte de Tn3 por el antígeno deseado. En otra realización, se reduce la duración del tiempo permitido para que la matriz de soporte de Tn3 se una al antígeno deseado.

10 En otra realización, se puede incluir un paso de unión competitiva en el ensayo de interacción proteína-proteína. Por ejemplo, se puede dejar que la matriz de soporte de Tn3 se una primero a un antígeno inmovilizado deseado. A continuación, se añade una concentración específica de antígeno no inmovilizado que sirve para competir por la unión con el antígeno inmovilizado de modo que las matrices de soporte de Tn3 con la menor afinidad por el antígeno se eluyan del antígeno inmovilizado lo cual resulta en la selección de las matrices de soporte de Tn3 con una mayor afinidad de unión al antígeno. La rigurosidad de las condiciones del ensayo se puede incrementar aún más aumentando la concentración del antígeno no inmovilizado que se añade al ensayo.

15 Los métodos de criba también pueden requerir múltiples rondas de selección para enriquecer una o más de las matrices de soporte de Tn3 con una unión al antígeno mejorada. En una realización, en cada ronda de selección se introducen más mutaciones aminoacídicas en la matriz de soporte de Tn3. En otra realización, en cada ronda de selección se incrementa la rigurosidad de la unión al antígeno deseado para seleccionar las matrices de soporte de Tn3 con una mayor afinidad por el antígeno.

20 En algunas realizaciones, se lleva a cabo una maduración de la afinidad mediante la mutagénesis por saturación de porciones de los bucles BC, DE y FG de Tn3. En algunas realizaciones, la mutagénesis por saturación se lleva a cabo utilizando mutagénesis de Kunkel. En otras realizaciones, la mutagénesis por saturación se lleva a cabo utilizando PCR.

25 En algunas realizaciones, se aplican al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más de cinco rondas de maduración de la afinidad. En algunas realizaciones, la mutagénesis por saturación se aplica únicamente a un bucle, mientras que en algunas realizaciones diferentes, se muta únicamente un bucle o una porción de un bucle durante una ronda de maduración de la afinidad. En algunas realizaciones, más de un bucle o porciones de uno o más de un bucle se mutan durante la misma ronda de maduración de la afinidad.

30 En otras realizaciones, los bucles BC, DE y FG mutaron simultáneamente durante la misma ronda de maduración de la afinidad.

En el caso de los monómeros para crear matrices de soporte de Tn3 multiméricas que se unan a epítopos diferentes de la misma diana, cada especificidad de unión se puede cribar de forma independiente.

35 En algunas realizaciones, los bucles se aleatorizan utilizando una colección de expresión en fagos. En algunas realizaciones, la unión de una matriz de soporte de Tn3 a una diana deseada se puede determinar utilizando métodos reconocidos en la técnica. Además, las secuencias de aminoácidos de las matrices de soporte de Tn3 identificadas en las cribas se pueden determinar utilizando métodos reconocidos en la técnica.

40 En algunas realizaciones, las matrices de soporte monoméricas con afinidad madura de la invención exhiben una mayor afinidad por CD40L de al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 40 veces, al menos 60 veces, al menos 80 veces o al menos 100 veces más o superior en comparación con la misma matriz de soporte de Tn3 antes de la maduración de la afinidad, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales o mediante otros ensayos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las matrices de soporte monoméricas con afinidad madura de la invención tienen una constante de disociación (K_d) inferior a 5 μ M, inferior a 1 μ M, inferior a 500 μ M, inferior a 250 μ M, inferior a 100 μ M o inferior a 50 μ M, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales o mediante otros ensayos conocidos en la técnica.

45 Estos métodos de maduración de la afinidad se pueden aplicar para desarrollar matrices de soporte de Tn3 con propiedades de unión mejoradas deseables tales como una mayor afinidad u otras características deseables, tales como propiedades farmacocinéticas favorables, potencia alta, baja inmunogenia, mayor o menor reactividad cruzada, etc.

50 Generación de repeticiones en tándem

El enlace de constructos en tándem, un dímero formado enlazando dos subunidades monoméricas específicas para CD40L, se puede generar ligando oligonucleótidos en sitios de restricción utilizando enzimas de restricción conocidas en la técnica que incluyen, sin carácter limitante, enzimas de restricción de tipo II y de tipo IIS.

Las matrices de soporte de Tn3 multiméricas de la invención pueden comprender un conector en el extremo C y/o el extremo N y/o entre dominios tal como se ha descrito en la presente. Además, las matrices de soporte de la invención que comprenden al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o matrices de soporte polipeptídicas se pueden fusionar o conjugar con un dominio de dimerización que incluye, sin carácter limitante, un resto de anticuerpo seleccionado entre:

- 5 (i) un fragmento Fab que contiene los dominios VL, CL, VH y CH1;
- (ii) un fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1;
- (iii) un fragmento Fd que contiene los dominios VH y CH1;
- 10 (iv) un fragmento Fd' que contiene los dominios VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1;
- (v) un fragmento Fv que contiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo;
- (vi) un fragmento dAb que consiste en un dominio VH;
- (vii) regiones CDR aisladas;
- 15 (viii) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra;
- (ix) moléculas de anticuerpo monocatenario (p. ej., Fv monocatenario; scFv);
- (x) un "diacuerpo" con dos sitios de unión al antígeno, que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica;
- 20 (xi) un "anticuerpo lineal" que comprende un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno;
- (xii) un anticuerpo completo; y
- (xiii) una región Fc que comprende CH2-CH3, que puede comprender además toda o una porción de una región de bisagra y/o una región CH1.

25 Producción de las matrices de soporte de Tn3

La expresión recombinante de una matriz de soporte de Tn3 de la invención requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique la matriz de soporte de Tn3. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifique una matriz de soporte de Tn3, el vector para la producción de la matriz de soporte de Tn3 se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas muy conocidas en la técnica. Por lo tanto, en la presente se describen métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una matriz de soporte de Tn3. Se pueden utilizar métodos con los que estarán muy familiarizados los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifiquen matrices de soporte polipeptídicas y señales de control traduccionales y transcripcionales adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención proporciona, por lo tanto, vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una matriz de soporte de Tn3 de la invención, unida operablemente a un promotor.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan posteriormente mediante técnicas convencionales para producir una matriz de soporte de Tn3 de la invención. Por consiguiente, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica una matriz de soporte de la invención, unido operablemente a un promotor heterólogo. Las células huésped adecuadas incluyen, sin carácter limitante, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* y *B. subtilis*).

Se pueden utilizar varios sistemas de vectores de expresión en huéspedes para expresar las matrices de soporte de Tn3 de la invención. Tales sistemas de expresión en huéspedes representan vehículos mediante los cuales se pueden producir y posteriormente purificar secuencias codificantes de interés, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos adecuadas, pueden expresar una matriz de soporte de la invención *in situ*. Estos incluyen, sin carácter limitante, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cósmido que contienen secuencias que codifican matrices de soporte o sistemas celulares de mamíferos (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, NSO y 3T3).

Por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2009/058379 se describen métodos útiles para producir las matrices de soporte de Tn3 de la invención. Una vez que se ha producido una matriz de soporte de la invención por expresión recombinante, esta se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para purificar una proteína.

- 5 En algunas realizaciones, las matrices de soporte de la invención se pueden producir en una forma glicosilada reemplazando residuos aminoácidos que se pueden glicosilar durante la expresión recombinante. En una realización específica, se pueden reemplazar aminoácidos de serina en un conector de glicina-serina (p. ej., la SEQ ID NO: 131 o la SEQ ID NO: 132) por otros residuos aminoácidos tales como alanina, glicina, leucina, isoleucina o valina (remítase, p. ej., a las SEQ ID NOs: 140, 141, 142 y 143) para prevenir la glicosilación durante la expresión recombinante. En algunas realizaciones específicas, se elimina un sitio de N-glicosilación de una matriz de soporte de Tn3 de la invención. En otras realizaciones, una matriz de soporte de la invención se puede desglicosilar después de la expresión recombinante. En la técnica se conocen métodos de desglicosilación *in vitro* después de la expresión recombinante que emplean, p. ej., cócteles enzimáticos (por ejemplo, los kits PFGasa F, Enodo F Multi, Orela O-linked Glycan Release, Enzymatic CarboRelease y Enzymatic DeGlycoMx deglycosylation comercializados por QA-bio, Palm Desert, CA).

Se puede escalar la producción de las matrices de soporte de Tn3 de la invención en el laboratorio de investigación para producir matrices de soporte en reactores a escala analítica o reactores a escala de producción, tal como se describe en la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2010-0298541 A1.

Producción escalable de matrices de soporte de Tn3 secretadas

- 20 Las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden producir intracelularmente o como una forma secretada. En algunas realizaciones, las matrices de soporte secretadas están debidamente plegadas y son totalmente funcionales. Las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden producir mediante un proceso escalable. En algunas realizaciones, las matrices de soporte se pueden producir mediante un proceso escalable de la invención en el laboratorio de investigación que se puede escalar para producir las matrices de soporte de la invención en biorreactores a escala analítica (por ejemplo, sin carácter limitante, biorreactores de 5L, 10L, 15L, 30L o 50L). En otras realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 se pueden producir mediante un proceso escalable de la invención en el laboratorio de investigación que se puede escalar para producir las matrices de soporte de Tn3 de la invención en biorreactores a escala de producción (por ejemplo, sin carácter limitante, 75L, 100L, 150L, 300L o 500L). En algunas realizaciones, el proceso escalable de la invención produce poca o ninguna reducción en la eficiencia de producción en comparación con el proceso de producción llevado a cabo en el laboratorio de investigación.

Conectores

- Las subunidades monoméricas en una matriz de soporte de Tn3 multimérica se pueden conectar mediante conectores proteicos y/o no proteicos, donde cada conector está fusionado a al menos dos subunidades monoméricas. Un conector adecuado puede consistir en un conector proteico, un conector no proteico y combinaciones de estos. Las combinaciones de conectores pueden ser homoméricas o heteroméricas. En algunas realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención comprende una pluralidad de subunidades monoméricas donde todos los conectores son idénticos. En otras realizaciones, una matriz de soporte de Tn3 multimérica comprende una pluralidad de subunidades monoméricas donde al menos uno de los conectores es funcional o estructuralmente diferente del resto de los conectores. En algunas realizaciones, los propios conectores pueden contribuir a la actividad de una matriz de soporte de Tn3 multimérica mediante su participación directa o indirecta en la unión a una diana.

En algunas realizaciones, el conector proteico es un polipéptido. El polipéptido conector debe tener una longitud, que sea adecuada para enlazar dos o más subunidades monoméricas, de forma que asuman la conformación correcta entre sí para que retengan así la actividad deseada.

- 45 En una realización, el conector polipeptídico comprende de 1 a aproximadamente 1000 residuos aminoácidos, de 1 a aproximadamente 50 residuos aminoácidos, 1-25 residuos aminoácidos, 1-20 residuos aminoácidos, 1-15 residuos aminoácidos, 1-10 residuos aminoácidos, 1- 5 residuos aminoácidos, 1-3 residuos aminoácidos. La invención proporciona además ácidos nucleicos, tales como ADN, ARN o combinaciones de ambos, que codifican la secuencia del conector polipeptídico. Los residuos aminoácidos seleccionados para su inclusión en el conector polipeptídico deben exhibir propiedades que no interfieran de forma significativa con la actividad o función de la matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención. Por lo tanto, un conector polipeptídico no debe exhibir en general un cambio que fuera incompatible con la actividad o función de la matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención, ni interferir con el plegamiento interno, ni formar enlaces u otras interacciones con residuos aminoácidos en una o más subunidades monoméricas que impidieran seriamente la unión de la matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención a CD40L.

- 55 En la bibliografía hay constancia del uso de conectores peptídicos tanto naturales como artificiales para conectar polipéptidos en polipéptidos de fusión conectados novedosos. Por consiguiente, los conectores que fusionan dos o

más subunidades monoméricas son conectores naturales, conectores artificiales o combinaciones de estos. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de todos los conectores peptídicos presentes en una matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención son idénticas. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de al menos dos de los conectores peptídicos presentes en una matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención son diferentes.

En algunas realizaciones, un conector polipeptídico posee flexibilidad conformacional. En algunas realizaciones, una secuencia de conector polipeptídico comprende una secuencia de aminoácidos (G-G-G-G-X)_m donde X es alanina (A), serina (S), glicina (G), isoleucina (I), leucina (L) o valina (V) y m es un número entero positivo (remítase a, p. ej., SEQ ID NO: 209). En una realización específica, una secuencia de conector polipeptídico comprende una secuencia de aminoácidos (G-G-G-G-S)_m donde m es un número entero positivo (remítase a, p. ej., la SEQ ID NO: 147). En otra realización específica, una secuencia de conector polipeptídico comprende una secuencia de aminoácidos (G-G-G-G-G)_m donde m es un número entero positivo (remítase a, p. ej., la SEQ ID NO: 148). En otra realización específica adicional, una secuencia de conector polipeptídico comprende una secuencia de aminoácidos (G-G-G-G-A)_m donde m es un número entero positivo (remítase a, p. ej., la SEQ ID NO: 149). En algunas realizaciones, un conector polipeptídico es un polipéptido artificial o natural no estructurado inherentemente (remítase a, p. ej., Schellenberger *et al.*, Nature Biotechnol. 27:1186-1190, 2009; remítase también a Sickmeier *et al.*, Nucleic Acids Res. 35:D786-93, 2007).

El conector peptídico se puede modificar de modo que se introduzca un residuo aminoacídico que comprenda un grupo de enlace para un resto no polipeptídico. Algunos ejemplos de estos residuos aminoacídicos pueden ser un residuo de cisteína (al cual se enlaza posteriormente el resto no polipeptídico) o la secuencia de aminoácidos puede incluir un sitio de N-glicosilación *in vivo* (enlazando de este modo un resto de azúcar (*in vivo*) al conector peptídico).

En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de todos los conectores peptídicos presentes en el multímero polipeptídico son idénticas. Como alternativa, las secuencias de aminoácidos de todos los conectores peptídicos presentes en el multímero polipeptídico pueden ser diferentes.

25 Marcaje o conjugación de las matrices de soporte de Tn3

Las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden utilizar en forma no conjugada o conjugada con al menos uno de diversos restos heterólogos para facilitar la detección de la diana o para el diagnóstico por imágenes o la terapia. Las matrices de soporte de Tn3 se pueden marcar o conjugar ya sea antes o después de la purificación, cuando se realiza una purificación.

Muchos restos heterólogos carecen de grupos funcionales adecuados a los que las matrices de soporte de Tn3 de la invención se puedan enlazar. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la molécula efectora se enlaza a la matriz de soporte a través de un conector, donde el conector contiene grupos reactivos para la conjugación. En algunas realizaciones, el resto heterólogo conjugado con una matriz de soporte de Tn3 de la invención puede funcionar como conector. En otras realizaciones, el resto se conjuga con la matriz de soporte de Tn3 a través de un conector que puede ser escindible o no escindible. En una realización, la molécula enlazante escindible es una molécula enlazante escindible redox, de modo que la molécula enlazante sea escindible en entornos con un potencial redox inferior, tal como el citoplasma y otras regiones con concentraciones superiores de moléculas con grupos sulfhidrilo libres. Los ejemplos de moléculas enlazantes que se pueden escindir debido a un cambio en el potencial redox incluyen aquellas que contienen disulfuros.

En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se modifican para proporcionar grupos reactivos para la conjugación. En tales matrices de soporte, el extremo N y/o el extremo C también puede servir para proporcionar grupos reactivos para la conjugación. En otras realizaciones, el extremo N se puede conjugar con un resto (tal como, sin carácter limitante, PEG), mientras que el extremo C está conjugado con otro resto (tal como, sin carácter limitante, biotina) o viceversa.

La expresión "polietilenglicol" o "PEG" se refiere a un compuesto polietilenglicólico o un derivado de este, con o sin agentes de acoplamiento, restos activantes o de acoplamiento (p. ej., con tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, N-hidroxisuccinimida o un resto maleimida). Se pretende que el término "PEG" indique polietilenglicol de un peso molecular comprendido entre 500 y 150 000 Da, incluidos sus análogos, donde, por ejemplo, el grupo OH terminal ha sido reemplazado por un grupo metoxi (denominado mPEG).

Las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden derivatizar con polietilenglicol (PEG). El PEG es un polímero hidrosoluble lineal constituido por unidades que se repiten de óxido de etileno con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares que normalmente varían entre aproximadamente 500 daltons y aproximadamente 40 000 daltons. En una realización específica, los PEG empleados tienen pesos moleculares comprendidos entre 5000 daltons y aproximadamente 20 000 daltons. Los PEG acoplados a las matrices de soporte de la invención pueden estar ramificados o no ramificados. Remítase, p. ej., a Monfardini, C. *et al.* 1995 Bioconjugate Chem 6:62-69. Los PEG son comercializados por Nektar Inc., Sigma Chemical Co. y otras compañías. Tales PEG

incluyen, sin carácter limitante, monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S- NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES) y monometoxipolietilenglicol-imidazolilcarbonilo (MePEG-IM).

- 5 Resumiendo, el polímero hidrofílico que se emplea, por ejemplo, PEG, está bloqueado en un extremo con un grupo no reactivo tal como un grupo metoxi o etoxi. Posteriormente, el polímero se activa en el otro extremo por reacción con un agente activante adecuado, tal como haluros cianúricos (por ejemplo, cloruro, bromuro o fluoruro cianúrico), carbonildiimidazol, un reactivo anhídrico (por ejemplo, un anhídrido dihalosuccínico, tal como anhídrido dibromosuccínico), azida acíclica, éter *p*-diazoniumbencílico, 3-(*p*-diazoniumfenoxi)-2-éter hidroxipropílico y similares.
- 10 El polímero activado se hace reaccionar posteriormente con un polipéptido como los descritos en la presente para producir un polipéptido derivatizado con un polímero. Como alternativa, se puede activar un grupo funcional en las matrices de soporte de Tn3 para que reaccione con el polímero o se pueden unir los dos grupos en una reacción de acoplamiento concertado utilizando métodos de acoplamiento conocidos. Se apreciará fácilmente que los polipéptidos de la invención se pueden derivatizar con PEG utilizando numerosos esquemas de reacción diferentes que son de
- 15 uso habitual y con los que estarán familiarizados los expertos en la técnica. Un PEG se puede acoplar a una matriz de soporte de la invención en uno o más grupos funcionales en cualquiera de los extremos de la matriz de soporte de Tn3 o dentro de la matriz de soporte de Tn3. En ciertas realizaciones, el PEG se acopla al extremo N o al extremo C.

En otras realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención, los análogos o derivados de estas se pueden conjugar con un agente de diagnóstico o detectable. Tales matrices de soporte de Tn3 pueden ser útiles para

20 monitorizar o pronosticar el desarrollo o el avance de una enfermedad como parte de un procedimiento de evaluación clínica, tal como la determinación de la eficacia de una terapia particular.

La presente invención abarca además los usos de las matrices de soporte de Tn3 conjugadas con un resto terapéutico. Una matriz de soporte de Tn3 se puede conjugar con un resto terapéutico tal como una citotoxina, p. ej., un agente citostático o citocidal, un agente terapéutico o un ión metálico radioactivo, p. ej., emisores alfa. Una citotoxina o agente

25 citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células.

Ensayos de las matrices de soporte de Tn3

La afinidad de unión y otras propiedades de unión de una matriz de soporte de Tn3 a un antígeno se pueden determinar mediante diversos métodos de ensayo *in vitro* conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, métodos de equilibrio (p. ej., ensayo inmunoensayo (ELISA) o análisis cinético (p. ej., análisis BIACORE®), y otros métodos tales como

30 ensayos de unión indirecta, ensayos de unión competitiva, electroforesis en gel y cromatografía (p. ej., filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar un marcador en uno o más de los componentes que se estén examinando y/o emplear diversos métodos de detección que incluyen, sin carácter limitante, marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos. Se puede consultar una descripción detallada de las propiedades cinéticas y las afinidades de unión en Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4.^a Ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999).

35 En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se unen específicamente a una diana con unas propiedades cinéticas específicas. En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención pueden tener una constante de disociación o K_d (K_{off}/K_{on}) inferior a $1 \times 10^{-2}M$, $1 \times 10^{-3}M$, $1 \times 10^{-4}M$, $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$, $1 \times 10^{-7}M$, $1 \times 10^{-8}M$, $1 \times 10^{-9}M$, $1 \times 10^{-10}M$, $1 \times 10^{-11}M$, $1 \times 10^{-12}M$, $1 \times 10^{-13}M$, $1 \times 10^{-14}M$ o inferior a $1 \times 10^{-15}M$. En realizaciones específicas, las matrices de soporte de Tn3 de la invención tienen una K_d de 500 μM , 100 μM , 500 nM, 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o inferior según se determina mediante un ensayo BIAcore® o mediante otros ensayos conocidos en la técnica.

40

En una realización alternativa, la afinidad de las matrices de soporte de Tn3 de la invención se describe en términos de la constante de asociación (K_a), que se calcula como la relación k_{on}/k_{off} , de al menos $1 \times 10^2 M^{-1}$, $1 \times 10^3 M^{-1}$, $1 \times 10^4 M^{-1}$, $1 \times 10^5 M^{-1}$, $1 \times 10^6 M^{-1}$, $1 \times 10^7 M^{-1}$, $1 \times 10^8 M^{-1}$, $1 \times 10^9 M^{-1}$, $1 \times 10^{10} M^{-1}$, $1 \times 10^{11} M^{-1}$, $1 \times 10^{12} M^{-1}$, $1 \times 10^{13} M^{-1}$, $1 \times 10^{14} M^{-1}$, $1 \times 10^{15} M^{-1}$ o al menos $5 \times 10^{15} M^{-1}$.

45

En ciertas realizaciones, la velocidad a la que las matrices de soporte de Tn3 de la invención se disocian de un epítipo diana puede ser más relevante que el valor de la K_d o la K_a . En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención tienen una k_{off} inferior a $10^{-3} s^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-3} s^{-1}$, inferior a $10^{-4} s^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-4} s^{-1}$, inferior a $10^{-5} s^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-5} s^{-1}$, inferior a $10^{-6} s^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-6} s^{-1}$, inferior a $10^{-7} s^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-7} s^{-1}$, inferior a $10^{-8} s^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-8} s^{-1}$, inferior a $10^{-9} s^{-1}$, inferior a $5 \times 10^{-9} s^{-1}$ o inferior a $10^{-10} s^{-1}$.

50

En otras realizaciones, la velocidad a la que las matrices de soporte de Tn3 de la invención se asocian con un epítipo diana puede ser más relevante que el valor de la K_d o la K_a . En este caso, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se unen a una diana con una velocidad k_{on} de al menos $10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^6 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^7 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ o al menos $10^8 M^{-1}s^{-1}$ o al menos $10^9 M^{-1}s^{-1}$.

Las matrices de soporte de Tn3 de la invención también se pueden adherir a soportes sólidos que son particularmente útiles para los inmunoensayos o la purificación del antígeno diana. Estos soportes sólidos incluyen, sin carácter limitante, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L

5 La invención proporciona matrices de soporte de Tn3 que se unen específicamente a CD40L. En realizaciones específicas, las matrices de soporte de la invención se unen específicamente al CD40L humano. En otras realizaciones específicas, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se unen a homólogos de CD40L de ratón, gallina, *Rhesus*, cinomólogo, rata o conejo. En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se unen a un epítipo expuesto de CD40L. Tales realizaciones incluyen el CD40L expresado endógenamente en células y/o células transfectadas para expresar ectópicamente el receptor.

10 En algunas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención reconocen epítipos expresados en un CD40L monomérico. En otras realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención reconocen epítipos expresados en una forma trimérica de CD40L. En otras realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención reconocen epítipos expresados en un CD40L unido a la membrana. En otras realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención reconocen epítipos expresados en CD40L soluble.

15 En otras realizaciones adicionales, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se unen a CD40L monomérico y previenen o interfieren con la oligomerización de las moléculas de CD40L. En otras realizaciones adicionales, las matrices de soporte de la invención reducen o inhiben la interacción de CD40L con CD40. En otras realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 agonizan la señalización celular mediada por CD40L. En otras realizaciones adicionales, las matrices de soporte de Tn3 antagonizan la señalización celular mediada por CD40L.

20 La descripción también proporciona métodos para modular la actividad de CD40L utilizando las matrices de soporte de Tn3 que se describen en la presente. En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden poner en contacto un CD40L con matrices de soporte específicas para CD40L, y bloquear la interacción entre CD40 y CD40L. En otras realizaciones, los métodos de la invención comprenden poner en contacto una célula que expresa CD40L con una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L y prevenir la escisión proteolítica de CD40L de la superficie celular. En otras realizaciones, los métodos de la invención comprenden poner en contacto un monómero de CD40L con una matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L y prevenir la oligomerización de CD40L. En otras realizaciones, la dimerización u oligomerización de CD40L se puede conseguir utilizando las matrices de soporte de Tn3 multiméricas.

25 En algunas realizaciones, los métodos de la descripción comprenden la administración de una matriz de soporte específica para CD40L que reduce una respuesta inmunitaria mediada por CD40 (remítase, p. ej., a Elqueta *et al.* 229: 152-172, 2009) o una vía de señalización posterior iniciada por la unión de CD40 a CD40L, según se mide mediante ensayos rutinarios conocidos en la técnica.

30 Sin que ello suponga ceñirse a ninguna teoría particular, las matrices de soporte de CD40L de la presente invención podrían funcionar previniendo la unión de CD40L a CD40, uniéndose al CD40L soluble y secuestrándolo, alterando la interacción de CD40L con CD40 pero sin prevenir la unión, previniendo o incrementado la escisión enzimática mediada por metaloproteasas de CD40L de la superficie celular para proporcionar CD40L soluble, previniendo o incrementando la endocitosis de CD40L en la superficie celular, etc.

Secuencias de unión a CD40L específicas

35 En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 de la invención comprende subunidades monoméricas específicas para CD40L que comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis secuencias de bucles que se unen a CD40L.

40 En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas específicas para CD40L comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis secuencias de bucles de clones monoméricos que se unen a CD40L seleccionadas entre: 309 (clon de la familia 309 original aislado de la colección de Tn3 virgen; SEQ ID NO: 20), 309FGwt (clon 309 original con un bucle FG humanizado; SEQ ID NO: 22), 340 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 24), 341 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 26), 342 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 146), 343 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 30), 344 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 32), 345 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 34), 346 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 36), 347 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 38), 348 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 40), 349 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 42), 311 (clon de la familia 311 original aislado de la colección de Tn3 virgen; SEQ ID NO: 44), 311K4E (variante del clon de la familia 311 procedente de la primera ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 46); 311K4E_1 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 48), 311K4E_2 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 50); 311K4E_3 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 52); 311K4E_4 (variante del clon de la

familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 54); 311K4E_5 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 56); 311K4E_7 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 58); 311K4E_8 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 60); 311K4E_9 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 62); 311K4E_10 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 64); 311K4E_11 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 66); 311K4E_12 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 68); 311K4E_13 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 70); 311K4E_14 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 72); 311K4E_15 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 74); 311K4E_16 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 76); 311K4E_19 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 78); 311K4E_20 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 80) y 311K4E_21 (variante del clon de la familia 311 procedente de la segunda ronda de maduración de la afinidad; SEQ ID NO: 82).

En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas específicas para CD40L comprenden al menos una secuencia de bucle seleccionada entre las secuencias de bucles enumeradas en la TABLA 2. En otras realizaciones, las subunidades monoméricas específicas para CD40L comprenden al menos una secuencia del bucle BC seleccionada entre las secuencias del bucle BC enumeradas en la TABLA 2. En otras realizaciones, las subunidades monoméricas específicas para CD40L comprenden al menos una secuencia del bucle DE seleccionada entre las secuencias del bucle DE enumeradas en la TABLA 2. En otras realizaciones, las subunidades monoméricas específicas para CD40L comprenden al menos una secuencia del bucle FG seleccionada entre las secuencias del bucle FG enumeradas en la TABLA 2.

En algunas realizaciones, las subunidades monoméricas específicas para CD40L comprenden una secuencia del bucle BC seleccionada entre las secuencias del bucle BC enumeradas en la TABLA 2; y una secuencia del bucle DE seleccionada entre las secuencias del bucle DE enumeradas en la TABLA 2. En otras realizaciones, las subunidades monoméricas específicas para CD40L comprenden una secuencia del bucle BC seleccionada entre las secuencias del bucle BC enumeradas en la TABLA 2; y una secuencia del bucle FG seleccionada entre las secuencias del bucle FG enumeradas en la TABLA 2. En otras realizaciones, las subunidades monoméricas específicas para CD40L comprenden una secuencia del bucle DE seleccionada entre las secuencias del bucle DE enumeradas en la TABLA 2; y una secuencia del bucle FG seleccionada entre las secuencias del bucle FG enumeradas en la TABLA 2. En algunas realizaciones, una subunidad monomérica específica para CD40L comprende secuencias de bucles correspondientes a secuencias de bucles de uno, dos o tres clones de Tn3 diferentes.

En ciertas realizaciones, cuando la secuencia de las matrices de soporte monoméricas específica para CD40L contiene un conector y/o un marcador de histidina (p. ej., un marcador His-8) en el extremo C de la secuencia o aminoácidos N-terminales adicionales, este conector C-terminal y/o marcador de histidina y los aminoácidos N-terminales adicionales se pueden eliminar, y por lo tanto la secuencia de aminoácidos correspondiente contiene una deleción de las secuencias del conector C-terminal y el marcador His y el aminoácido o los aminoácidos N-terminales adicionales.

En algunas realizaciones, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende una única subunidad monomérica, p. ej., la secuencia del clon 342 (clon 309 con afinidad madura; SEQ ID NO: 28 y/o SEQ ID NO: 146). En otras realizaciones, la matriz de soporte específica para CD40L comprende más de una subunidad monomérica, p. ej., dos subunidades monoméricas del clon 342 (SEQ ID NO: 28 y/o SEQ ID NO: 146) en tándem (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 135). En realizaciones específicas, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se conjugan con una variante de HSA (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 134 y la SEQ ID NO: 135). En realizaciones adicionales, la HSA se puede conjugar en el extremo N o el extremo C de la matriz de soporte de Tn3 multimérica.

En un aspecto específico, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende una única subunidad monomérica 311K4E_12, un conector GS y una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 201). En otro aspecto específico, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende una única subunidad monomérica 311K4E_12 con una variante CELTYG de una hebra beta C, un conector constituido íntegramente por glicina (todo glicina) y una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 202). En otra realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende dos subunidades 311K4E_12 en tándem y dos conectores GS, donde uno de los conectores GS conecta las subunidades entre sí y un segundo conector GS conecta una subunidad a una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 203). En otra realización específica adicional, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende dos subunidades 311K4E_12 en tándem y dos conectores constituidos íntegramente por glicina, donde uno de los conectores constituidos íntegramente por glicina conecta las subunidades entre sí y un segundo conector constituido íntegramente por glicina conecta una subunidad a una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 204).

En una realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende dos subunidades 309 conectadas en tándem a través de un conector GS (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 205). En otra realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende una única subunidad 309 conectada a una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 206). En otra realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende dos subunidades 309 en tándem y dos conectores GS, donde uno de los conectores GS conecta las subunidades entre sí y un segundo conector GS conecta una subunidad a una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 207).

En una realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende una única subunidad monomérica 342, un conector GS y una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 134). En otra realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende una única subunidad monomérica 342, un conector constituido íntegramente por glicina y una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 144). En otra realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende dos subunidades 342 en tándem y dos conectores GS, donde uno de los conectores GS conecta las subunidades entre sí y un segundo conector GS conecta una subunidad a una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 135). En otra realización específica adicional, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende dos subunidades 342 en tándem y dos conectores constituidos íntegramente por glicina, donde uno de los conectores constituidos íntegramente por glicina conecta las subunidades entre sí y un segundo conector constituido íntegramente por glicina conecta una subunidad a una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 145). En otra realización específica adicional, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende dos subunidades 342 conectadas en tándem a través de un conector GS (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 208).

En una realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende, en otra realización específica, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende una subunidad 311 o una subunidad derivada de 311 (p. ej., 311K4E_12) y una subunidad 309 o una subunidad derivada de 309 (p. ej., 342) en tándem y dos conectores GS, donde un conector GS conecta las subunidades entre sí y un segundo conector GS conecta una subunidad a una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 135). En otra realización específica adicional, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L comprende una subunidad 311 o una subunidad derivada de 311 (p. ej., 311K4E_12) y una subunidad 309 o una subunidad derivada de 309 (p. ej., 342) en tándem y dos conectores constituidos íntegramente por glicina, donde uno de los conectores constituidos íntegramente por glicina conecta las subunidades entre sí y un segundo conector constituido íntegramente por glicina conecta una subunidad a una variante de HSA C34S (remítase, p. ej., a la SEQ ID NO: 145).

En la FIG. 2A se muestran ejemplos de matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L bivalentes en tándem y fusiones con albúmina sérica (SA) (remítase también a la FIG. 9A). Aunque se proporcionan conectores específicos en la FIG. 2A, se contemplan otros conectores como los proporcionados en la presente. Aunque se puede utilizar SA madura natural, p. ej., albúmina sérica murina (MSA) o albúmina sérica humana (HSA), se contempla que se puedan sustituir uno o más residuos aminoacídicos de cisteína (C) en la SA madura, por ejemplo, por serina (S), alanina (A), glicina (G), etc.

A continuación, se muestran constructos representativos. La secuencia de la SA está subrayada. Los conectores están en un recuadro. Se sobreentenderá que numerosas variaciones quedan incluidas dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, los conectores se pueden alterar (en la presente se proporcionan varios ejemplos no limitantes), el primero o los dos residuos aminoacídicos N-terminales (SQ) pueden estar ausentes y/o sustituidos con residuos aminoacídicos alternativos, se puede incorporar un marcador (p. ej., marcador 6xHis), se pueden utilizar matrices de soporte específicas para CD40L alternativas (p. ej., aquellas basadas en el 10.º dominio Fn3 de la fibronectina) en un constructo similar, etc.

Constructo 1 de HSA monovalente 342 (SEQ ID NO: 134)

[monómero 342]-conector (G₄S)₂-HSA_{C34S}

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR
HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
FLGMFLYEYARRHPDYSVVLNQLCQLVLEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

Constructo 2 de HSA monovalente 342 (SEQ ID NO: 144)

[monómero 342]-conector G₁₀-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR
HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
FLGMFLYEYARRHPDYSVVLNQLCQLVLEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

5 Constructo 1 de HSA bivalente 342 (SEQ ID NO: 135)

[monómero 342]-conector (G_{4S})₃-[monómero 342]-conector (G_{4S})₂-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTEYEVSLICRSGDMS
SNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQOSPFDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPNLRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCASLQKFGGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD
YSVVLNQLCQLVLEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

ES 2 819 075 T3

Construceto 2 de HSA bivalente 342 (SEQ ID NO: 145)

[monómero 342]-conector G₁₅-[monómero 342]-conector G₁₀-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKP
DTEYEVSILICRSGDMSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKP
DTEYEVSILICRSGDMSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQOSPFDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENC
DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE
IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAA
CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFG
ERAFKAWAVARLS QRFPAEFAEVSKLVTDLT
TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDS
ISSKLKECCE KPLLEKSHCIAEVENDEMPADL
PSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
EYARRHPD YSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAAD
PHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC
ELFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPT
LVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMP
CAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCCT
ESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAET
FTFHADICTLSEKE RQIKKQTALVELVKHK
PKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Construceto 1 de HSA monovalente 311K4E_12 (SEQ ID NO: 201)

5 [monómero 311K4E_12]-conector (G₄S)₂-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVSILICLTTDGTYNPAKETFTTGGGGSGGGGS
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL VLI
AFAQYLQOSPFDHV KLVNEVTEFAKTCVADE
SAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRE
TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE
IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAAD
KAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CAS
LQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSK
LVTDLT
TKVHTECCHGDLLECADDRADLAK YICENQDS
ISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADL
PSLAADFVESKDVCKNYAEA KDVFLGMFLY
EYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAAD
PHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLIKQNC
ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPT
LVEVSRNLGKVGSKCCKHPE AKRMP
CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCT
ESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF NAET
FTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHK
PKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Construceto 2 de HSA monovalente 311K4E_12 (SEQ ID NO: 202)

[monómero 311K4E_12]-conector G₁₀-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVSILICLTTDGTYNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLI
AFAQYLQOSPFDHV KLVNEVTEFAKTCVADE
SAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRE
TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE
IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAAD
KAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CAS
LQKFGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSK
LVTDLT
TKVHTECCHGDLLECADDRADLAK YICENQDS
ISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADL
PSLAADFVESKDVCKNYAEA KDVFLGMFLY
EYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAAD
PHECYAKVFDEFKPLVE EPQNLIKQNC
ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPT
LVEVSRNLGKVGSKCCKHPE AKRMP
CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCT
ESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF

Construeto 1 de HSA bivalente 311K4E_12 (SEQ ID NO: 203)

[monómero 311K4E_12]-conector G₄S₃-[monómero 311K4E_12]-conector (G₄S)₂-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVS LI CL TTDGTYNNPAKETFTTGGGGSGGGSGGGGSRLDAPSQIEVEDVTDTT
ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVS LI CL
TTDGTYNPAKETFTTGGGGSGGGSGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOS
PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQ
EPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPEL
FFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAW
AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSK
LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EY
ARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKONCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK
LVAASQAALGL

Construeto 2 de HSA bivalente 311K4E_12 (SEQ ID NO: 204)

5 [monómero 311K4E_12]-conector G₁₅-[monómero 311K4E_12]-conector G₁₀-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVS LI CL TTDGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVEDVTDTT
ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVS LI CL
TTDGTYNPAKETFTTGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOS
PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQ
EPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPEL
FFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAW
AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSK
LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EY
ARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKONCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK
LVAASQAALGL

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, por ejemplo, sin carácter limitante, una composición farmacéutica, que contiene una o una combinación de matrices de soporte de Tn3 de la presente invención, formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir una o una combinación de, por ejemplo, sin carácter limitante, dos o más matrices de soporte de Tn3 de la invención diferentes. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la descripción puede comprender una combinación de matrices de soporte de Tn3 que se unen a epítopos diferentes en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias. En un aspecto específico, una composición farmacéutica comprende una única matriz de soporte de Tn3 monomérica de la invención. En un aspecto específico, una composición farmacéutica comprende una matriz de soporte de Tn3 multimérica de la invención. En otro aspecto específico más, una composición farmacéutica comprende una matriz de soporte de Tn3 dimérica de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción también se pueden administrar en terapia combinada, tal como, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir una matriz de soporte de Tn3 de la presente invención combinada con al menos una terapia adicional donde la terapia puede ser inmunoterapia,

quimioterapia, radioterapia o terapia con fármacos. Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables.

Métodos de empleo de las matrices de soporte de la presente descripción

5 Las matrices de soporte de Tn3 de la presente invención tienen utilidades terapéuticas y diagnósticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a las células en un cultivo, p. ej., *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto, p. ej., *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar diversos trastornos.

10 La descripción también proporciona métodos de empleo de las matrices de soporte de Tn3 de la invención. La presente descripción también abarca el uso de las matrices de soporte de Tn3 de la invención para prevenir, diagnosticar, controlar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con enfermedades, trastornos patológicos o trastornos que incluyen, sin carácter limitante, el cáncer, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios e enfermedades infecciosas, ya sea solas o combinadas con otras terapias. La descripción también abarca el uso de las matrices de soporte de Tn3 de la invención conjugadas o fusionadas con un resto (p. ej., agente terapéutico o fármaco) para prevenir, controlar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con enfermedades, trastornos o infecciones que incluyen, sin carácter limitante, el cáncer, trastornos inflamatorios y autoinmunitarios e enfermedades infecciosas, ya sea solas o combinadas con otras terapias.

15 La descripción también proporciona métodos para el bloqueo de epítopos que no se consigue fácilmente con anticuerpos convencionales. Por ejemplo, en un aspecto, las matrices de soporte de Tn3 de la descripción se pueden utilizar para bloquear primero un antígeno adyacente y durante la unión, otro dominio de unión se puede acoplar al antígeno críptico.

20 La descripción también proporciona métodos de empleo de las matrices de soporte de Tn3 de la invención para juntar tipos de células diferentes. En un aspecto, las proteínas de la invención pueden unirse a una célula diana con un dominio de unión y reclutar otra célula a través de otro dominio de unión. En otro aspecto, la primera célula puede ser una célula cancerosa y la segunda célula es una célula efectora inmunitaria tal como un linfocito NK. En otro aspecto, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden utilizar para fortalecer la interacción entre dos células diferentes, tales como una célula presentadora de antígeno y un linfocito T, con el fin de estimular posiblemente la respuesta inmunitaria.

25 La descripción también proporciona métodos de empleo de las matrices de soporte de Tn3 para reducir una población celular. En un aspecto, los métodos de la invención son útiles en la reducción de los siguientes tipos de células: eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, mastocitos, monocitos y células tumorales.

30 La descripción también proporciona métodos de empleo de las matrices de soporte de Tn3 como reactivos de diagnóstico. Tales reactivos de diagnóstico se podrían utilizar para evaluar la presencia o ausencia de CD40L, la presencia del receptor CD40, la eficiencia de la unión de CD40L al receptor CD40, el CD40L libre en un paciente, el CD40L libre en una muestra o el CD40L unido al receptor CD40 en una muestra.

35 Las matrices de soporte de Tn3 de la invención y las composiciones que las comprenden son útiles para muchos propósitos, por ejemplo, como agentes terapéuticos contra una amplia gama de enfermedades y trastornos crónicos y agudos que incluyen, sin carácter limitante, enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias. Las composiciones y los métodos de la descripción que se describen en la presente son útiles para prevenir o tratar trastornos autoinmunitarios y/o trastornos inflamatorios.

40 Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios incluyen, sin carácter limitante, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, síndrome de Sjogren, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y de otros tipos, fibroplasia retrolental, degeneración macular asociada con la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluida la enfermedad de Grave), trasplante de cornea y de otros tejidos e inflamación crónica, sepsis, artritis reumatoide, peritonitis, enfermedad de Crohn, lesión por reperfusión, septicemia, choque endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (p. ej., artritis psoriásica), choque anafiláctico, isquemia orgánica, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo de injerto, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis herpetiforme, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (SFCDI), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, síndrome de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, artritis juvenil, líquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, conectivitis mixta, esclerosis múltiple, diabetes mellitus mediada por el sistema inmunitario o de tipo 1, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome

de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de Stiff-man, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerativa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis de la dermatitis herpetiforme, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

5 Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, sin carácter limitante, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica como resultado de infecciones víricas o bacterianas. Las composiciones y los métodos de la descripción se pueden utilizar con una o más terapias convencionales que se pueden utilizar para prevenir, controlar o tratar las enfermedades anteriores.

10 La descripción proporciona métodos para prevenir, controlar, tratar o mejorar el cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o infecciosas, o uno o más síntomas, o uno o más de sus síntomas, donde dichos métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una o más matrices de soporte de Tn3 de la invención combinadas con uno o más agentes terapéuticos que no sean agentes anticancerosos (también conocidos como, terapias no anticancerosas).

15 Los ejemplos de estos agentes incluyen, sin carácter limitante, agentes antieméticos, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, tales como antibióticos, agentes antiinflamatorios y agentes antivirales. Los ejemplos no limitantes de agentes antieméticos incluyen metopimazina y metoclopramida. Los ejemplos no limitantes de agentes antifúngicos incluyen fármacos azólicos, imidazol, triazol, polieno, amfotericina y ririmidina. Los ejemplos no limitantes de agentes antibacterianos incluyen dactinomicina, bleomicina, eritromicina, penicilina, mitramicina, cefalosporina, imipenem, 20 axtreonam, vancomicina, cicloserina, bacitracina, cloramfenicol, clindamicina, tetraciclina, estreptomycin, tobramicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, neomicina, espectinomycin, trimetoprim, norfloxacin, refampina, polimixina, amfotericina B, nistatina, cetocanazol, isoniazida, metronidazol y pentamidina. Los ejemplos no limitantes de agentes antivirales incluyen análogos de nucleósidos (p. ej., zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarbina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina), foscaret, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, interferón ("IFN") α , β o γ y AZT. Los 25 ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroides ("AINE"), fármacos antiinflamatorios esteroides, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metilxantinas.

En un aspecto, la descripción comprende composiciones capaces de tratar la inflamación crónica. En un aspecto, las composiciones son útiles en el direccionamiento de células inmunitarias para su destrucción o desactivación. En un 30 aspecto, las composiciones son útiles en el direccionamiento de linfocitos T activados, linfocitos T inactivos, linfocitos B, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos o células dendríticas. En otro aspecto, la invención comprende composiciones capaces de reducir la función de las células inmunitarias. En otro aspecto, las composiciones son capaces de suprimir la función de las células inmunitarias.

En otro aspecto, la descripción comprende composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades del tubo 35 digestivo. Las matrices de soporte de la descripción exhiben un nivel alto de estabilidad en condiciones de pH bajo. La estabilidad a pH bajo sugiere que la composición será adecuada para la administración oral para varios trastornos gastrointestinales, tales como el síndrome del intestino irritable, el reflujo gastroesofágico, pseudoobstrucciones intestinales, síndrome de evacuación gástrica rápida, náuseas resistentes al tratamiento, úlcera péptica, apendicitis, colitis isquémica, colitis ulcerativa, gastritis, enfermedad por *Helicobacter pylori*, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, celiaquía, diverticulitis, diverticulosis, disfagia, hernia de hiato, trastornos por infecciones esofágicas, hipo, 40 mericismo y otros.

La descripción también proporciona composiciones combinatorias y métodos de empleo de tales composiciones en la 45 prevención, el tratamiento, la reducción o la mejora de la enfermedad o sus síntomas. Las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden combinar con terapias convencionales adecuadas para la prevención, el tratamiento, la reducción o la mejora de la enfermedad o sus síntomas. Las terapias convencionales representativas se pueden encontrar en Physician's Desk Reference (56.^a ed., 2002 y 57.^a ed., 2003). En algunos aspectos, las matrices de soporte de Tn3 de la descripción se pueden combinar con quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia con un agente biológico (anticuerpo o péptido), moléculas de bajo peso molecular u otra terapia conocida en la técnica. En algunos aspectos, la terapia combinatoria se administra a la vez. En otros aspectos, la terapia combinatoria se administra por separado.

50 La descripción también proporciona métodos para diagnosticar enfermedades. Las matrices de soporte de Tn3 de la descripción que se unen a una diana específica asociada con una enfermedad se pueden implementar en un método utilizado para diagnosticar dicha enfermedad. En un aspecto, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se utilizan en un método para diagnosticar una enfermedad en un sujeto, donde dicho método comprende obtener una muestra a partir del sujeto, poner en contacto la diana con la matriz de soporte de Tn3 en dicha muestra en condiciones que 55 permitan que se forme la interacción de diana:matriz de soporte, identificar el complejo de diana:matriz de soporte y de este modo se detecta la diana en la muestra. En otro aspecto, la enfermedad que se desea diagnosticar se describe en la presente.

La descripción también proporciona métodos para el registro gráfico de imágenes de dianas específicas. En un aspecto, las matrices de soporte de Tn3 de la invención conjugadas con contrastes tales como proteínas fluorescentes verdes, otros marcadores fluorescentes (Cy3, Cy5, rodamina y otros), biotina o radionucleidos se pueden utilizar en métodos para el registro gráfico de imágenes de la presencia, la ubicación y el avance de una diana específica. En algunos aspectos, el método para el registro gráfico de imágenes de una diana que comprende una matriz de soporte de Tn3 de la invención se lleva a cabo *in vitro*. En otros aspectos, el método para el registro gráfico de imágenes de una diana que comprende una matriz de soporte de Tn3 de la invención se lleva a cabo *in vivo*. En otros aspectos, el método para el registro gráfico de imágenes de una diana que comprende una matriz de soporte de Tn3 de la invención se lleva a cabo por MRI, barrido PET, rayos X, detección de fluorescencia y por otros métodos de detección conocidos en la técnica.

La descripción también proporciona métodos para monitorizar el avance, la recidiva, el tratamiento o la mejora de una enfermedad utilizando las matrices de soporte de la invención. En una realización, los métodos para monitorizar el avance, la recidiva, el tratamiento o la mejora de una enfermedad se llevan a cabo mediante los métodos de registro gráfico de imágenes, diagnóstico o poniendo un compuesto/diana en contacto con una matriz de soporte de Tn3 de la invención como las presentadas en la presente.

Dosificación y administración farmacéuticas

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen una matriz de soporte de Tn3 de la invención, se mezcla una matriz de soporte con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Para la administración, las composiciones están preferentemente exentas de pirógenos y están sustancialmente exentas de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. La selección de un régimen de administración para un agente terapéutico depende de varios factores que incluyen la tasa de renovación sérica o tisular de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenia de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En ciertos aspectos, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente que concuerde con un nivel aceptable de efectos secundarios.

Los niveles posológicos reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener así una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sea tóxica para el paciente. Los niveles posológicos seleccionados dependerán de diversos factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas o el éster, la sal o la amida de estas, la vía de administración, el periodo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales empleados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, el estado de salud general y el historial clínico anterior del paciente que se esté tratando, y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas.

Una composición de la presente descripción también se puede administrar a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de diversos métodos conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, las matrices de soporte de Tn3 de la invención se pueden formular para garantizar una distribución adecuada *in vivo*.

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar, sin utilizar nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente.

40 EJEMPLOS

A continuación, la invención se describe haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Construcción de una colección de 3 bucles en la matriz de soporte de Tn3 original

Se construyó una colección basándose en la matriz de soporte de Tn3 original, descrita en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2009/058379, donde esta se denomina "Tn3 SS4". La colección contenía regiones aleatorizadas de los bucles BC, DE y FG. Este diseño incorporaba la secuencia caracterizada y diversidad de longitudes de los bucles en la colección de Tn3, coherentes con los patrones de diversidad descritos para los dominios FnIII naturales, tres longitudes diferentes para los bucles BC y FG, y se empleó un esquema de codones mixtos "NHT" para introducir diversidad en la colección (H = A, T, C).. Este esquema generaba 12 codones que codificaban 12/20 aminoácidos (remítase a la TABLA 3), es decir, cada codón codificaba un único aminoácido. Es más, no hay ningún codón de parada o cisteína (Cys).

TABLA 3

A	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr
G	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala
C	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro
T	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser
	A	T	C

La diversidad de la colección se generó utilizando los oligonucleótidos degenerados que se muestran en la TABLA 4.

TABLA 4

Oligo	Bucle	Secuencia	SEQ ID NO
BC9 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTSCGNHTGSTNHTNHTNHTGG C TGTGAACTGACCTATGGCATTAAA	178
BC11 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTBSTNHTNHTNHTNHTNHT NHTGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA	179
BC12 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTVMACCGNHTNHTNHTRRCRGCNH T VTTNHTGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA	180
DE NHT	DE	CGATCGCACCACCATAGATCTGNHTNHTNHTNHTNHTTATAG CATTGGTAACCTGAAACCG	181
FG9 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSHTNHTGGTNHTNH T NHTKCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	182
FG10 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSHTNHTNHTNHTRG C NHTCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	183
FG11 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSHTNHTGGTNHTNH T AGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	184
Códigos de los nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T			

5 La colección se preparó utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la TABLA 5.

TABLA 5

Oligo	Secuencia	SEQ ID NO
BCX-DE bridge v2	CAGATCTATGGTGGTGCATCGCCCGGCACATCTTTAATGCCAT AGGTCAGTTCACA	185

DE-FGX bridge v2	GCAAATCAGGCTCACTTCATATTCGGTATCCGGTTTCAGGTTAC CAATGCTAT	186
KpnI amp rev v2	CGGGTTCGGTTGGGGTACCGCCACCGGTGGTAAAGGTTTCTTT	187
KpnI reverse v2	CGGGTTCGGTTGGGGTA	188
BC colección amp v2	GGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAAGATGTGACC G ATACCACCGCGCTGATTACCTGG	189

5 Se creó una mezcla de los oligonucleótidos degenerados (proporciones equimolares de los oligonucleótidos correspondientes a los bucles BC y FG, respectivamente), BCX-DE bridge v2, DE-FGX bridge v2 y KpnI amp rev v2 en una reacción PCR de 20 ciclos sin un exceso de cebadores externos. Este producto se diluyó y se amplificó en una reacción de PCR ordinaria utilizando los cebadores BC colección amp v2 y KpnI reverse v2. El producto resultante de la PCR generó un gen Tn3 completo que se digirió a continuación con *NcoI* y *KpnI*, y se ligó al vector de expresión en fagos (descrito en WO 2009/058379). El ADN se transformó en *E. coli* por electroporación. La diversidad final de la colección se estimó que era de aproximadamente 7.9×10^{10} miembros.

10 Tras la electroporación, la colección se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Se añadió el fago cooperador M13K07 y después de una hora las células se diluyeron hasta un volumen superior y se cultivaron a 37°C con agitación durante la noche. Al día siguiente, se retiraron los fagos y se concentraron a partir del sobrenadante por precipitación con PEG 8000.

Ejemplo 2

Adsorción de colecciones para matrices de soporte de Tn3 específicas para el CD40L humano

15 Se adsorbieron colecciones de Tn3 expresadas en fago que contenían $>10^{10}$ secuencias únicas frente a CD40L. La diversidad de estas colecciones se derivó de la variabilidad de las secuencias y longitudes en los bucles BC, DE y FG los cuales son análogos a los tres bucles CDR de un dominio variable de un anticuerpo. La selección de las proteínas de Tn3 líderes se llevó a cabo adsorbiendo colecciones en CD40L humano biotilado recombinante y una línea celular CHO que sobreexpresaba CD40L. Se utilizaron rondas alternas de adsorción frente a estos dos reactivos para garantizar que las líderes reconocerían el dominio extracelular recombinante, así como también el CD40L anclado en la membrana nativo.

25 Se biotiló el CD40L humano recombinante (MegaCD40L humano; Axxora) con EZ-Link sulfo-NHS-biotina (Pierce, Rockford, IL) utilizando un exceso molar del quintuple del reactivo biotilante. Tras incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, la muestra se dializó en PBS durante la noche para eliminar la biotina no conjugada. Se inmovilizaron 10 µg de CD40L biotilado sobre microesferas de estreptavidina M280 (Dyna, Carlsbad, CA) y a continuación se realizó un bloqueo con PBS que contenía 10 mg/ml de BSA durante 2 horas. El estímulo consistía en colecciones desarrolladas como se describe en el Ejemplo 1 o, adicionalmente, colecciones desarrolladas utilizando técnicas de construcción estándar, tales como las descritas en WO 2009/058379.

30 Los fagos se bloquearon en PBS que contenía 10 mg/ml de BSA durante 2 horas. El estímulo bloqueado se añadió a microesferas de estreptavidina M280 de control bloqueadas (sin diana) y se incubó en un agitador de balanceo durante 2 horas a temperatura ambiente para reducir la colección de ligantes a las microesferas. La colección reducida se añadió posteriormente a las microesferas recubiertas con CD40L y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de balanceo. Después de tres lavados con PBST (PBS + Tween al 0.1%) para eliminar el fago no unido, las microesferas se añadieron a células *E. coli* XL-1 Blue en fases de crecimiento exponenciales, que se coinfectaron subsecuentemente con el fago cooperador M13K07 en 60 ml de medio 2xYT que contenía 50 µg/ml de carbenicilina. Tras cultivar durante la noche a 37°C con agitación, se recogieron los fagos por precipitación con PEG a partir del medio que se había cultivado durante la noche.

40 La segunda ronda de adsorción (Ronda 2) se llevó a cabo en una línea celular CHO que sobreexpresaba CD40L. La colección de fagos se bloqueó en 3% de BSA/PBS con balanceo a temperatura ambiente durante 1 hora. Las células se desprendieron con Accutase (Invitrogen), se lavaron 2x con 5 ml de PBS y se bloquearon 10^7 células en 1 ml de 3% de BSA/PBS con balanceo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células bloqueadas se centrifugaron a 500xg, 5 minutos, se resuspendieron cuidadosamente en la solución de la colección de fagos bloqueados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el fago no unido lavando cuidadosamente las células 3 veces en 1 ml de 3% de BSA/PBS y una vez en PBS, y formando un pellet celular por centrifugación a 500xg durante 5 minutos en una microcentrífuga utilizando un tubo Eppendorf nuevo para cada lavado. El pellet celular se añadió

directamente a *E. coli* XL-1 Blue en fases de crecimiento exponenciales, que se procesaron posteriormente como se describe en la Ronda 1.

5 La Ronda de adsorción 3 se llevó a cabo como se describe en la Ronda 1, salvo que los fagos unidos se eluyeron añadiendo HCl 100 mM seguido de la neutralización con Tris-HCl 1 M, pH 8. Se utilizó fago neutralizado eluido para infectar las células *E. coli* XL1 Blue como se describe en la Ronda 1.

La Ronda de adsorción 4 nuevamente se llevó a cabo en células como se describe en la Ronda 2, salvo que se realizaron 5 lavados en 3% de BSA/PBS. La Ronda 5 se realizó utilizando 5 µg de MegaCD40L biotinilado, pero por lo demás al igual que se describe para la Ronda 3.

10 Después de 5 rondas de adsorción, se realizó una selección de las variantes de Tn3 resultantes como proteína soluble. Se utilizaron stocks de fagos amplificados y precipitados con PEG en una PCR para amplificar un conjunto de fragmentos que abarcaban las secuencias de Tn3 codificadas. Este conjunto de fragmentos se digirió con *NcoI* + *KpnI* y se clonó en los sitios *NcoI* - *KpnI* correspondientes del plásmido pSec-oppA(L25M)-Tn3 (remítase, por ejemplo, a WO 2009/058379). Se inocularon células *E. coli* BL21 DE3 transformadas con los constructos derivados pSec-oppA(L25M)-Tn3 en MagicMedia autoinductor (Invitrogen) que contenía carbenicilina (100 µg/ml) en placas de 96 pocillos profundos. Los cultivos se cultivaron durante 18 horas con agitación a 37°C y las células se separaron del medio por centrifugación. El medio que contenía variantes de Tn3 solubles secretadas se utilizó directamente en un ensayo de criba para la unión a CD40L.

20 Se cribaron diez grupos de 96 clones para identificar las proteínas Tn3 que se unían específicamente al CD40L recombinante. Resumiendo, el ensayo de criba empleó la captura de variantes de Tn3 marcadas con His solubles secretadas en el medio por unión a un anticuerpo anti-His inmovilizado en pocillos de microplacas. Tras la captura, el medio y la proteína en exceso se eliminaron por lavado, y la interacción entre las variantes de Tn3 capturadas y CD40L se monitorizó utilizando MegaCD40L humano biotinilado y midiendo la diana remanente (después de lavar la placa) mediante SA-HRP y con reactivos de ELISA convencionales.

25 En el paso de captura, el anticuerpo anti-His inmovilizado se saturó con Tn3 y la cantidad molar de Tn3 capturado en cada pocillo se volvió prácticamente idéntica independientemente de los niveles de expresión de los clones individuales. Esta normalización de los niveles de Tn3 dio como resultado niveles de ensayo proporcionales a la eficiencia de la interacción con la diana e inafectados por las diferencias potenciales en los niveles de expresión de la proteína.

30 Los positivos para este ensayo se secuenciaron para identificar 34 secuencias de Tn3 únicas que se unieron al CD40L recombinante. Entre el panel de secuencias de Tn3 que se unen a CD40L únicas, un subgrupo de 24 clones, que tenían una señal de ensayo robusta y unos buenos niveles de expresión a juzgar por la SDS-PAGE del sobrenadante del cultivo, se sometió a reexpresión y purificación a pequeña escala.

35 En resumen, se inocularon células *E. coli* BL21 DE3 transformadas con los constructos derivados pSec-oppA(L25M)-Tn3 en medio Superbroth que contenía carbenicilina (100 µg/mL) con 1% de glucosa. Los cultivos se cultivaron a 37°C hasta una densidad óptica (D.O.) de 0.5-0.8 y a continuación se indujeron con IPTG 0.2 mM. Tras agitar a 37°C durante 5 horas, las células se separaron del medio por centrifugación. La purificación de las matrices de soporte de Tn3 del medio se efectuó mediante purificación por lotes utilizando Ni-NTA Superflow (Qiagen), lavando en 2x PBS con imidazol 20 mM y eluyendo con 2x PBS con imidazol 250 mM. Las muestras se dializaron en PBS y las concentraciones se determinaron por absorbancia UV a 280 nm de acuerdo con Gill and von Hippel (Anal. Biochem. 182: 319, 1989).

40 Sobre la base de la clasificación del ensayo y el comportamiento SEC, la expresión de 8 líderes se escaló y se purificó hasta niveles de endotoxinas bajos (< 1 EU/mg) para su evaluación en un ensayo celular funcional.

Dos clones de Tn3 (denominados 309 y 311) mostraron una actividad similar en ensayos bioquímicos y a base de células (FIGS. 6A, 6B, 6C), y fueron 3-5 veces más potentes que el clon rival más próximo.

45 Las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano monovalentes 309 y 311 inhibieron el número total de linfocitos B, el número de células plasmáticas y la conmutación de clase de Ig (FIGS. 6A, 6B y 6C). La FIG. 6 A muestra el efecto inhibitorio de 309 y 311 sobre la expresión de CD86 inducida por HuCD40L en PBMC humanas positivas para CD19 estimuladas con células D1.1 Jurkat; la FIG. 6B muestra la inhibición de la proliferación de los linfocitos B estimulada por HuCD40L por parte de 309 y 311; y la FIG. 6C C muestra la inhibición del número de células plasmáticas en cocultivos de linfocitos T/B. También se demostró que 309 se une a linfocitos T primarios activados por FACS (los datos no se muestran). Se estimularon PBMC con MegaCD40L humano recombinante (Axxora) o células Jurkat que expresaban CD40L humano (D1.1, ATCC), y se midió el porcentaje de células CD19+/CD86+ por FACS después de 24 horas.

55 Los clones líderes 309 y 311 se monodispersaron y no presentaron ninguna tendencia a agregarse o formar oligómeros de orden superior en solución según se determinó mediante un análisis cromatográfico de exclusión por tañamos (SEC) de muestras purificadas (FIG. 7A).

Las estabildades térmicas de los clones líderes 309 y 311 se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (CDB) utilizando muestras proteicas con una concentración de 1 mg/ml en PBS a pH 7.2 y se compararon con la estabilidad térmica de la proteína Tn3 original (FIG. 7B). Los clones líderes 309 y 3011 tenían T_m de 70 ± 1 °C cuyo valor era solo ligeramente inferior a la T_m de la Tn3 original (72 °C).

- 5 Como no se identificaron clones con reactividad cruzada murinos se llevó a cabo un proceso de adsorción similar al descrito anteriormente para identificar la Tn3 específica murina denominada M13. M13 también presentó actividad en un ensayo a base de células PBMC (remítase a la FIG. 1A)

Ejemplo 3

Optimización de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L líderes

- 10 La optimización de la afinidad se utilizó para incrementar la potencia de los líderes de Tn3 seleccionados. En general, se realizaron una o más rondas de mutagénesis en los bucles de Tn3 por contacto con la diana, con la selección de variantes mejoradas a partir de colecciones de expresión en fagos combinatorias.

3.1 Intercambio de bucles

- 15 Con el fin de determinar cuáles de los 3 bucles en los dos líderes participaban en la interacción con CD40L, se generaron constructos en los que cada secuencia de bucle individual se modificó por la secuencia de bucle de la Tn3 original tal como se encuentra en la tenascina C humana. Se compararon las actividades de las variantes mutadas con las variantes originales en un ensayo de unión llevado a cabo como se describe para el ensayo de criba descrito anteriormente (FIG. 10A). Para ambos líderes la mutación de los bucles BC y DE provocó una pérdida completa de la unión a CD40L, mientras que la modificación del bucle FG por la secuencia de Tn3 original no producía ningún efecto (para 309) o un efecto limitado (311) sobre la unión. Por lo tanto, los bucles BC y DE parecían contener las secuencias principalmente responsables del contacto con CD40L, y por eso se seleccionaron fundamentalmente para optimizar la afinidad.

3.2 Optimización del líder 309 de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L

- 25 Como el experimento de intercambio de bucles indicó que la secuencia del bucle FG de 309 se podía sustituir con la secuencia del bucle FG de Tn3 original sin una pérdida sustancial de potencia de unión, se decidió utilizar este constructo (denominado 309FGwt) como base para la maduración de la afinidad. Esto eliminaría las mutaciones no esenciales que se desvíen de la secuencia de tenascina C original para reducir el riesgo de posible inmunogenia. Cabe notar que la secuencia del bucle FG de Tn3 original contenía un motivo RGD que se eliminó posteriormente mediante una mutación en las moléculas líderes finales. Se generaron tres colecciones de bucles BC y una colección de bucles DE.

- 30 Para las tres colecciones de bucles BC se realizaron tres rondas de PCR utilizando los oligos degenerados BC9 PCR, BC 9-loop NNK y 309 BC-loop NNKdope (TABLA 6) junto con el cebador inverso Kpn1 amp rev v2 (TABLA 5) utilizando un patrón derivado 309FGwt en el que los codones del bucle BC habían sido reemplazados por codones de parada. Posteriormente, la amplificación por PCR de dichos fragmentos con los cebadores BC colección amp v2 (TABLA 5) y Kpn1 reverse v2 proporcionó el fragmento de colección de Tn3 completo.

- 40 Para la colección de bucles DE con una amplificación por PCR con DE PCR y Kpn1 amp reverse v2 en un patrón derivado 309FGwt (en el cual los codones del bucle DE habían sido reemplazados por codones de parada) proporcionó un fragmento que contenía el bucle DE aleatorizado y el bucle FG de Tn3 natural, el cual se combinó con un fragmento que codificaba la región de Tn3 anterior al bucle DE generado por PCR con BC colección amp v2 y BCX-DE bridge v2 en un patrón de 309. Los dos fragmentos se unieron en una PCR solapante con los cebadores externos BC colección amp v2 y Kpn1 reverse v2.

TABLA 6: Oligonucleótidos de ADN empleados para generar la colección OL (optimización del líder) de 309FGwt

Oligo	Secuencia	SEQ ID NO
BC9 PCR	5'-ACCGCGCTGATTACCTGGTCT1213111GGCTGTGA ACTGACCTATGGCATTAAAGATG	190
BC 9-loop NNK	5'-ACCGCGCTGATTACCTGGNNKNNKSMGNNKGSTN NNKNNKNNKGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	191
309 BC-loop NNKdope	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG76K45K45K77K44K65K78 T45K44KTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	192

DE PCR	5'- 11111TATAGCATTGGTAACCTGAAACCGG-3'	193
Upstr BCloop Rev	CCAGGTAATCAGCGCGGTGGTAT	194
BC shuffle rev	CAGATCTATGGTGGTGGCGATCGC	195
DE shuffle FWD	TGTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGT	196
1= Codones para todo 19aa(-cys) 2= Codones para Ala/Pro 3= Codones para Ala/Gly;		
4= 70% de G, 10% de A, 10% de C, 10% de T 5= 10% de G, 70% de A, 10% de C, 10% de T		
6= 10% de G, 10% de A, 70% de C, 10% de T 7= 10% de G, 10% de A, 10% de C, 70% de T		
8= 70% de A, 15% de C, 15% de T K = 50% de G/50% de T		

Los fragmentos NcoI-KpnI se clonaron en el vector de expresión en fagos, y se generó una colección de fagos como se describe en el Ejemplo 1.

5 Las cuatro colecciones se adsorbieron por separado en MegaCD40L humano biotinilado como se describe en la primera ronda del Ejemplo 2, utilizando 4 µg de CD40L en la Ronda 1 y 1 µg en la Ronda 2. Tras amplificar el resultado en los fagos después de la Ronda 2, se aisló el ADN monocatenario utilizando el kit Qiagen Spin M13 (Qiagen, Valencia, CA), y las combinaciones de fragmentos que contenían el bucle BC de colecciones de bucles BC se amplificaron utilizando BC lib amp v2 y BC shuffle rev, mientras que la combinación de fragmentos que contenían el bucle DE se amplificó a partir de la colección de bucles DE utilizando los cebadores DE-shuffle FWD y KpnI reverse v2. Los fragmentos de PCR se purificaron en gel y se acoplaron a través de su secuencia solapante utilizando los cebadores externos BC lib amp v2 y KpnI reverse v2. El fragmento de PCR resultante se utilizó para generar una colección en el vector fágico como se describió anteriormente. Esta colección se adsorbió durante un total de 5 rondas en MegaCD40L humano biotinilado como se describe en el Ejemplo 2, salvo que las colecciones se pusieron en contacto inicialmente con una diana en una concentración de 50 nM, 20 nM, 20 nM y 10 nM (en un volumen total de 15 50 µl) para las Rondas 1-4 durante 2 horas antes de incubar con las microesferas magnéticas de estreptavidina M280 bloqueadas durante 10 minutos y después lavar.

Los resultados se clonaron en conjunto en los sitios *NcoI* - *KpnI* del plásmido pSec-oppA(L25M)-Tn3 pSec, y se cribaron dieciséis placas de 96 pocillos para determinar la unión a CD40L utilizando proteína soluble en el ensayo de criba descrito anteriormente. Se eligieron los 270 clones con el puntaje más alto, se volvieron a ensayar y se secuenciaron. Se seleccionaron diez clones para su caracterización detallada en función de un ensayo de unión y análisis secuencial. Esto incluyó la evaluación de la potencia en el ensayo en PBMC, la determinación de K_d para la unión a CD40L en un ensayo en biosensores, la estabilidad termodinámica determinada por calorimetría diferencial de barrido y la tendencia a agregarse o formar oligómeros de orden superior en solución por análisis cromatográfico de exclusión por tamaños. Los resultados se resumen en la TABLA 7. Las secuencias de los clones 309 y 309FGwt alineadas con los diez clones optimizados (denominados 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348 y 349) se muestran en las FIGS. 11A y 11B.

Las variantes con afinidad madura mostraron una potencia superior en 1-3 logs (unidades logarítmicas) al clon 309, mantuvieron una alta estabilidad según se midió por DSC y la mayoría se monodispersaron según se midió por SEC.

TABLA 7

Variante	PBMC IC50 (nM)	Kd (nM)	Perfil SEC	Tm, DSC (°C)
309	226	191	OK	72
309FGwt	760	nd	OK	71
340	0.7	2.2	OK	77
341	0.7	nd	OK(?)	71
342	0.7	1.4	OK	73
343	0.6	2.0	OK	69(?)
344	1.3	nd	OK	(65+78.5)
345	37.3	39	OK	72
346	9.0	14.9	OK	71
347	11.0	10.7	OK	70
348	1.0	1.8	?	nd
349	38.2	21	OK(?)	nd

30

Los ensayos en PBMC se realizaron estimulando PBMC con células Jurkat que expresaban CD40L humano (D1.1, ATCC) y se midió el porcentaje de células CD19+/CD86+ por FACS después de 24 horas. Este ensayo se utilizó para evaluar y clasificar el panel de matrices de soporte de Tn3 líderes para emerger a partir de la priorización basada en criterios bioquímicos. Los resultados de los ensayos en PBMC se muestran en la FIG. 10B y se resumen en la TABLA 7.

Las mediciones de la afinidad se realizaron en el sistema de análisis de la interacción entre proteínas ProteOn XPR36 (Bio-Rad, Hercules, CA) con un chip sensor GLC a 25°C. Se utilizó solución salina tamponada con fosfato ProteOn con Tween 20 al 0.005%, pH 7.4 (PBS/Tween), como tampón de análisis. Se inmovilizó MegaCD40L humano en el chip con una densidad superficial de aproximadamente 2300 RU. Se prepararon diluciones con un factor de dilución de 2 de las variantes de Tn3 (340, 342, 343, 345, 346, 347, 348 y 349) en PBS/Tween/0.5 mg/ml de BSA, pH 7.4 (de 150 a 4.7 nM). Se inyectaron muestras de cada concentración en los seis canales para el análisis con una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 300 segundos. La K_d se determinó utilizando el ajuste de análisis de equilibrio en el software ProteOn. Los resultados se muestran en la TABLA 7.

Se analizaron diez variantes de Tn3 específicas para TCD40L para determinar su estabilidad mediante CDB. Resumiendo, las mediciones de CDB se realizaron en un CDB VP-Capillary (MicroCal). Las proteínas se intercambiaron en PBS (pH 7.2) mediante diálisis exhaustiva y se ajustaron hasta una concentración de 0.25-0.5 mg/ml para el análisis por CDB. Las muestras se sometieron a un barrido de 20 a 95 °C a una velocidad de barrido de 90 °C/hora, sin repetición del barrido. Los resultados se muestran en la TABLA 7.

Se obtuvo una mejora hasta 300 veces superior en la CI_{50} respecto a 309 y una mejora 1000 veces superior respecto a la base 309FGwt utilizada para generar la colección de optimización del líder para los mejores clones. Siete clones tuvieron una K_d en el rango de nM de un único dígito.

3.3 Optimización del líder 311 de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L

Antes de realizar el experimento de uso de los bucles mencionado anteriormente (remítase a la FIG. 10A),

un intento inicial de una colección de optimización del líder se fundamentó en introducir diversidad en el bucle FG de 311, generando y cribando la colección de expresión en fago resultante. La criba se realizó después de 4 rondas de adsorción en MegaCD40L humano biotinilado como se describió previamente, y se descubrió que la mayoría de los resultados positivos contenían una mutación fortuita del residuo K4 a E en la región constante aminoterminal de Tn3, anterior al bucle BC. No se observó ningún consenso obvio entre las secuencias de los bucles FG de los resultados positivos. La introducción de la mutación K4E independiente en 311 provocó un aumento de aproximadamente 100 veces en la potencia (desde aproximadamente 4 µM hasta 36 nM) en el ensayo en PBMC (remítase a la FIG. 10C).

Como el experimento de intercambio de bucles indicó que las secuencias de los bucles BC y DE eran necesarias para la unión a CD40L, estos bucles fueron la diana en la base 311K4E para una maduración de la afinidad adicional. Se generaron dos colecciones independientes. Una colección tenía como diana el bucle BC con una estrategia en la que cada residuo tenía un 50% de posibilidades de ser la secuencia de 311 natural y aproximadamente un 50% de posibilidades de ser uno de los otros 11 residuos codificados NHT. La otra colección aleatorizaba completamente el bucle DE de 6 residuos.

Para la colección de bucles BC, se utilizaron los oligonucleótidos BC11-311Gly y BC11-311NHT (TABLA 8) en reacciones PCR con el cebador inverso KpnI amp rev v2 (TABLA 5) en un patrón derivado de 311 en el que los codones del bucle BC se habían reemplazado con codones de parada para generar fragmentos que incluían los bucles BC, DE y FG. Por último, la amplificación de una mezcla 1:1 de estos fragmentos con los cebadores BC colección amp K4E y KpnI amp rev v2 proporcionó el fragmento de colección de Tn3 completo.

La colección de bucles DE se generó como la colección de bucles DE de 309FGwt descrita anteriormente, salvo que se utilizó un patrón derivado de 311 en las reacciones PCR y se utilizó el cebador BC colección amp K4E en la amplificación por PCR final.

TABLA 8. Oligos empleados para generar la colección de optimización del líder 311K4E.

Oligo	Secuencia	SEQ ID
BC11-311 Gly	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	197
BC11-311NHT	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TNHTTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	198

BC colección amp K4E	5'-GGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAG ATGTGACCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGG-3'	199
BC11-311 Gly	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	197
BC11-311NHT	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TNHTTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	198
BC colección amp K4E	5'-GGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAG ATGTGACCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGG-3'	199
1=70% de G, 10% de A, 10% de C, 10% de T		2=10% de G, 70% de A, 10% de C, 10% de T
3=10% de G, 10% de A, 70% de C, 10% de T		4=10% de G, 10% de A, 10% de C, 70% de T
5=70% de A, 15% de C, 15% de T		6=15% de A, 70% de C, 15% de T
7=15% de A, 15% de C, 70% de T		V=33% de A, 33% de C, 33% de G
H=33% de A, 33% de C, 33% de T		

Los fragmentos de la colección completos se digirieron con NcoI y KpnI, se clonaron en el vector de expresión en fagos, y se generaron colecciones de fagos como se describe en el Ejemplo 1.

- 5 Las dos colecciones se adsorbieron por separado en MegaCD40L humano biotinilado como se describe en el Ejemplo 1, utilizando 10 g de proteína en la Ronda 1, 5 g en la Ronda 2 y 5 g en la Ronda 3. Tras la amplificación del resultado fágico después de la Ronda 3, se aisló ADN monocatenario utilizando un kit Qiagen (Qiagen, Valencia, CA), y las dos colecciones se transpusieron como se describe para las colecciones de 309FGwt. La colección transpuesta se adsorbió durante un total de 5 rondas en MegaCD40L humano biotinilado como se describe anteriormente para la colección transpuesta de 309FGwt utilizando 100 nM , 20 nM , 4 nM, 1 nM y 1 nM de diana en las Rondas 1-5.
- 10 Los resultados se clonaron en conjunto en el vector de secreción soluble como se describió previamente, y se cribaron cinco placas de 96 pocillos para determinar la unión a CD40L utilizando el ensayo de criba de proteína soluble descrito anteriormente. Los resultados positivos se identificaron con relación a la señal obtenida con la variante de la base 311K4E. Los 18 clones únicos con el puntaje más alto, denominados 311K4E_1, 311K4E_2, 311K4E_3, 311K4E_4, 311K4E_5, 311K4E_6, 311K4E_7, 311K4E_8, 311K4E_9, 311K4E_10, 311K4E_11, 311K4E_12, 311K4E_13, 311K4E_14, 311K4E_15, 311K4E_16, 311K4E_17, 311K4E_18 y 311K4E_19 (secuencias mostradas en la FIG. 12A y la FIG. 12B) se ensayaron como proteínas no purificadas crudas para la clasificación según la disociación. Se realizaron estimaciones de la disociación de matrices de soporte de Tn3 no purificadas en el sistema de análisis de la interacción entre proteínas ProteOn XPR36 (Bio-Rad, Hercules, CA) en una matriz biosensora con CD40L inmovilizado sobre un chip. Se inmovilizó MegaCD40L humano en un chip GLC (BioRad) y todas las variantes se diluyeron hasta una concentración estimada de 80 nM, se inyectaron con una velocidad de flujo de 30 µL/min durante 300 segundos con un tiempo de disociación fijado a 1200 segundos. Se utilizó PBS, Tween20 al 0.005%, EDTA 3 mM, pH7.4 como tampón de análisis. Las disociaciones se clasificaron por inspección visual de los sensogramas. Un subgrupo de cuatro variantes que presentaron las disociaciones más lentas, 311K4E_3, 311K4E_11, 311K4E_12 y 311K4E_15, se purificó y se determinó que los valores de K_d estaban comprendidos entre 1.1 y 6.4 nM (TABLA 9).
- 25 **TABLA 9.** K_d de 311K4E y 4 variantes purificadas por afinidad que se unen al CD40L humano.

Variante de 311	K_d (nM)
311K4E	18
311K4E_12	1.1
311K4E_11	6.3
311K4E_15	1.6
311K4E_3	6.4

Tal como se indica en la FIG. 10D, la reducción en la K_d (de 18 nM a 1 nM) de 311K4E_12 corresponde a un incremento de 12 veces en la potencia en el ensayo en PBMC relativo a la base 311K4E.

En conclusión, las campañas de optimización del líder de los resultados iniciales 309 y 311 a partir de las colecciones vírgenes condujeron a ligantes en el rango de nM de un único dígito de CD40L.

- 5 Se llevó a cabo una campaña de optimización similar en la molécula M13 específica para murinos (no se muestran los datos). La molécula específica para CD40L murino optimizada resultante (denominada M31) mostró un aumento de aproximadamente 20 veces en la potencia en el ensayo en PBMC frente a la molécula original (FIG. 1A).

Ejemplo 4

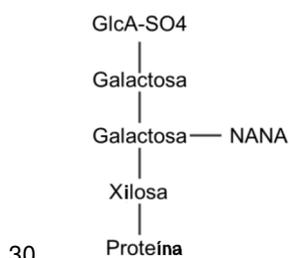
Expresión y purificación de fusiones Tn3-HSA específicas para CD40L no marcadas

- 10 Se expresaron constructos de Tn3 fusionados con HSA como los descritos en las FIGS. 2A y 9A en una línea celular 293F de mamífero mediante transfección transitoria. Se generaron constructos de expresión de la fusión Tn3-HSA basados en un vector de expresión de mamífero generado mediante fabricación propia. Para incrementar la homogeneidad del producto, se empleó una forma mutante de HSA (denominada HSA C34S) en la que la cisteína 34 parcialmente expuesta desapareada había mutado a serina (Zhao *et al.*, 2009, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72: 405-11).

- 15 La proteína de fusión se pudo purificar en una purificación de un paso mediante cromatografía de intercambio iónico (IEX). En la FIG. 9B se muestra un ejemplo de la elución de 309-309-HSA de una columna Q-HP (GE HealthCare) con un gradiente salino. Además del pico principal, se observaron picos de elución posterior menores (que constitúan menos de un 10% del área de picos total). El análisis por espectrometría de masas indicó que estos picos secundarios menores estaban enriquecidos en especies 309-309-HSA O-glicosiladas. Las fracciones que contenían el pico principal se juntaron y se utilizaron para ensayos de actividad subsecuentes.

- 20 Para las purificaciones a escala mayor, el paso de IEX mencionado anteriormente fue precedido por la captura de las fusiones de Tn3-HSA a partir del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía de afinidad utilizando matrices de afinidad de HSA, p. ej., HiTrap Blue HP (GE HealthCare). Tras lavar, la proteína de fusión HSA se consiguió eluir con un tampón que contenía ácido octenoico. El eluato se colocó en una columna Q-HP después de una dilución triple en tampón fosfato.

- 25 El análisis del pico o los picos menores reveló la presencia de restos carbohidrato unidos a través de O. Se propuso que el O-glicano se trataba de una mezcla heterogénea de carbohidratos derivados de una estructura central O-xilosilada reportada previamente (Wakabayashi *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.* 274:5436-5442) que se muestra a continuación:



- 35 Se determinó que el sitio predominante de la unión se encontraba en el conector GGGGS entre los dominios Tn3. Se comprobó también que el glicano estaba presente en menor medida en el conector GGGGS situado entre la Tn3 y la HSA. Los niveles de O-glicano fueron, por lo tanto, superiores en los constructos bivalentes en comparación con los constructos monovalentes y fueron superiores en el material producido en las células HEK en comparación con las células CHO. Los niveles también variaron entre los constructos de Tn3 diferentes. Por consiguiente, el nivel de O-glicano se puede reducir mediante una sección cuidadosa de las células huésped, por ejemplo, el uso de células CHO u otras células que se comprobó que producían material con niveles inferiores de O-glicano. Además, el material que contiene el O-glicano se puede eliminar mediante métodos de purificación para obtener un producto más homogéneo que carezca del O-glicano. Como alternativa, el conector se puede modificar para eliminar el sitio o los sitios principales de unión del O-glicano, por ejemplo, mutando el residuo Ser a uno Gly. Los conectores en varios constructos se diseñaron de nuevo para que contuvieran uno o más conectores GGGGG. No se detectaron O-glicanos de ningún tipo en el material que contenía el o los conectores GGGGG y no se observó ninguna diferencia en la actividad (los datos no se muestran).

Ejemplo 5**Extensión de la semivida sérica de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L**

La fusión con albúmina sérica se exploró como estrategia para prolongar la semivida sérica de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L. Para determinar las propiedades farmacocinéticas (PK, por sus siglas en inglés) de las fusiones de Tn3-MSA específicas para CD40L murino se llevó a cabo un ensayo PK de ratón. Las fusiones con MSA se eligieron para estudios de moléculas surrogadas frente a las fusiones con HSA correspondientes debido a que el FcRn de ratón se une a HSA con un enlace considerablemente más débil que con el que se une a MSA, lo cual da como resultado un menor reciclaje a partir de endosomas y consecuentemente una mayor regeneración (Andersen *et al. J. Biol. Chem.* 285, 4826-4836, 2010).

Las células HEK 293 se utilizaron para expresar la matriz de soporte de Tn3 bivalente en tándem específica para CD40L de ratón fusionada con MSA. Se observaron unos niveles de expresión altos (FIG. 3A). Estos constructos tenían un conector (G₄S) entre las unidades de matriz de soporte de Tn3 y 3 repeticiones (G₄S) en el conector entre la matriz de soporte y MSA. Además, se introdujo una mutación N49Q en cada una de las matrices de soporte M13 y M31 para eliminar un sitio de N-glicosilación potencial. Esta mutación no afectó a la potencia de estas matrices de soporte (los datos no se muestran). El nivel de expresión se estimó que era de 200 mg/L 6 días después de la transfección. La purificación se llevó a cabo mediante IMAC a través de un marcador His C-terminal. La producción de proteína purificada se estimó que era de 125 mg/L de sobrenadante de cultivo.

Cuando se fusionó MSA con matrices de soporte M13 bivalentes, se observó una reducción del óctuple en la potencia en comparación con la matriz de soporte M13 dimérica sin MSA (FIG. 3B). Una matriz de soporte bivalente que comprendía M31 con afinidad madura fusionada con MSA fue 140 veces más potente que la matriz de soporte M13 bivalente correspondiente fusionada con MSA, aproximadamente 900 veces más potente que la fusión de M31 monovalente con MSA, y tenía una potencia comparable con la del anticuerpo monoclonal anti-CD40L murino MR1 (FIG. 3C).

Para determinar las propiedades PK de las fusiones de Tn3 específica para CD40L-MSA se llevó a cabo un análisis PK de ratón. Los constructos proteicos se administraron por vía intravenosa en una dosis de 10 mg/kg en ratones CD-1 hembra de 5-7 semanas. Se extrajeron muestras de 150 µL de sangre de cada ratón en puntos de evaluación diferentes y se determinó la concentración sérica de la fusión Tn3-HSA mediante un ensayo ELISA. Resumiendo, se recubrieron placas Nunc MaxiSorp con el anticuerpo anti-FLAG M2 (Agilent), se bloquearon con leche al 4% en PBS+Tween al 0.1%(PBST) y se incubaron con MegaCD40L murino (Axxora). El MegaCD40L se inmovilizó a través de su marcador FLAG. Las muestras séricas y los estándares proteicos se diluyeron en leche al 4% en PBST y se añadieron después de lavar la placa en PBST. Tras incubar, la placa se lavó en PBST y se utilizó anticuerpo policlonal anti-TN3 de conejo (Covance) para detectar los constructos de fusión de Tn3-HSA utilizando anticuerpo de conejo producido en cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) en un protocolo de ELISA estándar. Las concentraciones en muestras séricas se determinaron en función de curvas de regresión lineal estándar generadas mediante ensayos de dilución del mismo constructo de fusión de Tn3-MSA. Las concentraciones se determinaron como un promedio para 3 ratones diferentes.

Como se puede observar en la FIG. 4A, M31-MSA y M13-M13-MSA tuvieron semividas de 38 y 31 horas, respectivamente, mientras que el constructo de M31-M31-HSA tuvo una semivida de 12 horas. En comparación, el constructo en tándem de M13-M13 por sí solo (sin estar fusionado con MSA) presentó una semivida de 30 minutos (no se muestra).

En contraste con las observaciones de las matrices de soporte de ratones, cuando HSA se fusionó con matrices de soporte específicas para CD40L humano no hubo ninguna reducción significativa en la potencia. La FIG. 9C muestra que no hubo ninguna reducción significativa en la potencia fusionando una matriz de soporte de Tn3 bivalente específica para CD40L humano que comprendía dos monómeros 309 con HSA según se midió en ensayos en PMBC.

Las propiedades PK del constructo monomérico 342-HSA específico para CD40L humano se comparó con las de una variante de 342-HSA que comprendía dos sustituciones (L463N y K524L) para incrementar la semivida sérica en monos cinomólogos después de una única inyección intravenosa. Los constructos proteicos se administraron por inyección en bolo lenta en una dosis de 10 mg/kg a monos cinomólogos macho que pesaban 2-5 kg. Se extrajo 1 ml de sangre/animal/punto de la evaluación de los vasos sanguíneos periféricos antes de la dosis, 5 minutos y 30 minutos después de la dosis; 2, 12, 24 y 48 horas después de la dosis; y los Días 4, 8, 11, 15, 22, 29, 36, 43 y 57. La concentración sérica de la fusión de Tn3-HSA se determinó mediante un ensayo ELISA. Resumiendo, se recubrieron placas Nunc MaxiSorp con el anticuerpo anti-FLAG M2 (Agilent), se bloquearon con leche al 4% en PBS+Tween al 0.1%(PBST) y se incubaron con MegaCD40L humano (Axxora). El MegaCD40L se inmovilizó a través de su marcador FLAG. Las muestras séricas y los estándares proteicos se diluyeron en leche al 4% en PBST y se añadieron después de lavar la placa en PBST. Tras incubar, la placa se lavó en PBST y se utilizó anticuerpo policlonal anti-TN3 de conejo (Covance) para detectar los constructos de fusión de Tn3-HSA utilizando anticuerpo de conejo producido en cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) en un protocolo de ELISA estándar. Las concentraciones en

muestras séricas se determinaron en función de curvas de regresión lineal estándar generadas mediante ensayos de dilución del mismo constructo de fusión de Tn3-HSA. Las concentraciones se representan en la FIG. 4B. La semivida del constructo de 342-HSA fue de aproximadamente 7 días, mientras que el constructo variante de 342-HSA L463N/K524L mostró un aumento en la semivida de 13-17 días durante la fase lineal inicial (FIG. 4B). Después de 30 días, las concentraciones séricas del constructo variante de 342-HSA L463N/K524L se redujeron más rápidamente en comparación con el constructo de HSA natural. Estas observaciones pueden indicar cierta inmunogenia de este constructo en monos.

Ejemplo 6

Caracterización de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L

6.1 Métodos experimentales

6.1.1 Ensayo de estimulación en PBMC: Se extrajo sangre de donantes sanos de acuerdo con las pautas de seguridad de MedImmune. Se aislaron PBMC mediante tubos CPT (centrifugación a 1500 g durante 20 minutos) y se estimularon 1×10^6 PBMC (por afección) con MegaCD40L humano recombinante (Axxora) o células Jurkat que expresaban CD40L humano (D1.1, ATCC). El porcentaje de células CD19+/CD86+ se midió mediante FACS después de estimular durante 24 horas. Este ensayo se utilizó para evaluar y clasificar el panel de matrices de soporte de Tn3 líderes para emerger a partir de la priorización basada en criterios bioquímicos. El ensayo también se puede llevar a cabo con una línea celular que exprese CD40L murino (D10.G4) o MegaCD40L murino (Axxora ALX522120) en vez de la estimulación con células humanas o proteína recombinante ya que el ligando murino presenta reactividad cruzada con el receptor humano.

6.1.2 Ensayo de NFκB/CD40R murino: Las células NIH3T3 indicadoras de NFκB (sistema de indicador de NFκB de Panomics y transfección de mCD40R interna) se estimularon con la proteína recombinante MegaCD40L murina (Axxora, cat. ALX522120) o células D10.G4 que sobreexpresaban CD40L (ATCC) durante 24 horas con o sin matrices de soporte de Tn3. Se añadió Bright-Glow (Promega E2610) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La lectura fue de la luminiscencia (700) a través de la activación indicadora de NFκB realizada en un sistema EnVision (Perkin Elmer).

6.1.3 Ensayo de NFκB/CD40R humano: Las células HEK293 indicadoras (Panomics e internamente) se estimularon con la proteína recombinante MegaCD40L (Axxora ALX522110) o células subclónicas Jurkat D1.1 que sobreexpresaban CD40L (ATCC) durante 24 horas con o sin matrices de soporte de Tn3. Se añadió Bright-Glow (Promega E2610) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La lectura fue de la luminiscencia (700) a través de la activación indicadora de NFκB realizada en un sistema EnVision (Perkin Elmer).

6.1.4 Ensayo de células duales: Se aislaron linfocitos T/B primarios de varios donantes. Se cultivaron linfocitos T CD4+ humanos estimulados con anti-CD3 y tratados con mitomicina C (1×10^5) con linfocitos B humanos purificados (5×10^4). Las lecturas fueron las siguientes: Día 2: marcadores de la activación (FACS), Día 5: proliferación de linfocitos B (metabolito ATP, Cell-Titer Glo, Invitrogen), Día 7: diferenciación celular plasmática (FACS), Día 7: producción de Ig (ELISA, R&D Systems).

6.1.5 Ensayos de agregación plaquetaria: El difosfato de adenosina (ADP) era de Chrono-Log (Havertown, PA, EE. UU.). Todos los demás productos eran al menos de calidad de reactivo. Se extrajeron muestras de sangre de voluntarios sanos en citrato de sodio 12.9 mM y se centrifugaron a 150xg durante 15 minutos para obtener PRP (siglas en inglés de plasma rico en plaquetas). Tras la separación de PRP, los tubos se centrifugaron de nuevo a 1200xg durante 15 minutos para obtener PPP (plasma con un bajo contenido de plaquetas). Las plaquetas se lavaron utilizando el método descrito por Mustard *et al.* (*Br. J. Haematol.* 22:193-204, 1972) y se resuspendieron en solución de Tyrode que contenía CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, dextrosa al 0.1%, albúmina sérica bovina al 0.35%, 0.05 U/ml de apirasa, pH 7.35. La agregación plaquetaria se estudió utilizando un agregómetro de transmisión de la luz (Chrono-Log 700-4DR, Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, EE. UU.) y se registró durante 10 min tras la estimulación de plaquetas con los agonistas plaquetarios indicados tal como se describe. Se preincubaron matrices de soporte de Tn3 con el CD40L soluble (sCD40L) para formar inmunocomplejos antes de la adición.

6.1.6 Ensayos de inmunización: Se adquirieron eritrocitos de oveja (SRBC, por sus siglas en inglés) en Colorado Serum (Denver, CO) y se diluyeron 10 veces en medio HBSS justo antes de usarlos. Se inmunizaron ratones con 0.2 ml de SRBC diluidos el día 0. Se ensayó la respuesta en el centro germinal (GC) primaria en ratones estimulados 14 días después de la inmunización mediante FACS (linfocitos B en GC, linfocitos B no GC y todos los subgrupos de linfocitos T). Las matrices de soporte de Tn3 y los controles se administraron los Días 9-13 en incrementos de 24 horas tal como se indica.

6.1.7 Ensayos de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T específicos para KLH (TDAR): Se realizaron administraciones a monos cinomólogos (*Macaca fascicularis*) de origen chino y que pesaban 3.1-4.6 kg, (Covance Research Products, Alice TX) por vía intravenosa (vena safena o cefálica) una vez por semana con la dosis indicada (0.5, 5, 40 mg/kg) de inhibidor (342-monómero-Tn3-HSA y 342-342 bivalente-Tn3-HSA o control/vehículo. Se

reconstituyó KLH (N.º de lote MD158678A, proveedor Pierce Biotechnologies, Rockford, Illinois) con la cantidad adecuada de agua estéril para inyección (proveedor Midwest Veterinary Supply, Norristown, Pensilvania) en condiciones estériles. Los viales se removieron para mezclarlos y después se combinaron en un vial estéril. Se administró 1 ml de solución de KLH (10 mg/ml) por vía subcutánea en la espalda de cada animal, hacia la izquierda de la línea central en dos ocasiones (Día 1 y Día 29), durante el transcurso de 1 hora desde el final de la administración del artículo de prueba o control. Se extrajeron muestras de sangre para un análisis posterior de todos los animales en los siguientes puntos de evaluación: antes de la prueba y los Días 4, 6, 8, 11, 15, 22, 25, 32, 34, 36, 39, 43, 46, 50 y 57. Las muestras se extrajeron los Días 8, 15 y 22 antes de administrar la dosis. La evaluación de las titulaciones de los anticuerpos IgM e IgG específicos para KLH se realizaron los Días 8, 11 y 15. Las titulaciones de los anticuerpos IgM e IgG específicos para KLH del Día 15 se muestran en las Figuras 5G y 5H, respectivamente. El método de titulación de punto de inflexión empleó un formato ELISA para detectar anticuerpos anti-KLH en suero de mono. Las muestras se incubaron con KLH, que estaba inmovilizada en una placa de ELISA. Tras incubar, las placas se lavaron y los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos anti-IgG o IgM de mono producidos en cabra conjugados con HRP y a continuación se visualizaron con tetrametilbencidina (TMB).

Para todos los experimentos en los que se utilizaron animales, se siguieron las buenas prácticas zootécnicas aceptables en la actualidad, p. ej., Manual para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio; National Academy Press, 2011. Huntingdon Life Sciences, East Millstone, Nueva Jersey completamente acreditada por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de los Animales de Laboratorio Internacional (AAALAC). Los animales fueron monitorizados por el personal técnico para controlar cualesquiera condiciones que requirieran cuidados veterinarios y fueron tratados según procediese.

6.2 Las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L neutralizan funcionalmente las interacciones CD40L: CD40.

Los linfocitos T que expresan CD40L se acoplan con linfocitos B que expresan CD40 lo cual produce la activación de la vía de señalización de NFκB (Zangani, 2009). Por lo tanto, se utilizó una línea celular indicadora de NFκB-luciferasa para determinar si las moléculas de anti-CD40L-Tn3 podrían inhibir la señalización posterior al acoplamiento de CD40. Se estimularon células HEK293 que expresaban CD40L humano y el indicador con MegaCD40L humano o murino en CE₉₀ (concentración eficaz que provoca un 90% de inhibición; es decir, 1.5 µg/ml para el MegaCD40L humano y 3 µg/ml para el MegaCD40L murino).

Las 342 moléculas específicas para humanos inhibieron la actividad de NFκB inducida por CD40L humano con una CI₅₀ de 1.5 nM (FIG. 13). La molécula M31 específica para murinos neutralizó la actividad de NFκB inducida por CD40L murino con una CI₅₀ = 1.6 nM (FIG. 1B). Tanto los anticuerpos monoclonales anti-CD40L de control positivo 5c8 (anti-CD40L humano) como MR1 (anti-CD40L murino) funcionaron aproximadamente 10 veces mejor que las matrices de soporte de Tn3 monoméricas con CI₅₀ de 0.200 nM +/- SD (umbral más bajo del ensayo). Esto se podría deber en parte a la naturaleza bivalente de los anticuerpos monoclonales que contribuyen a la avidéz de la interacción con sus respectivos CD40L.

6.3 Las matrices de soporte de Tn3 diméricas específicas para CD40L exhiben una unión mejorada.

Los datos experimentales indican que la unión de una matriz de soporte de Tn3 bivalente específica para CD40L mejoró frente a la de una matriz de soporte de Tn3 monomérica específica para CD40L. La unión de la matriz de soporte de Tn3 bivalente específica para CD40L a CD40L mejoró la acción sobre la diana, en algunos casos aproximadamente 3 logs frente a la de una matriz de soporte de Tn3 monomérica específica para CD40L *in vitro*, como se muestra en la FIG. 2C y la FIG. 2D (murino), y la FIG. 8A y la FIG. 8B (humano).

La FIG. 2C muestra la inhibición competitiva de la unión de CD40L murino al receptor CD40 murino inmovilizado en un chip biosensor por parte de matrices de soporte específicas para CD40L murino (M13) monovalentes o bivalentes en tándem. Los monómeros M13 estaban unidos con conectores peptídicos de longitud variable que comprendían una (1GS), tres (3GS), cinco (5GS) o siete repeticiones (7GS) "GGGGS". La CI₅₀ de la matriz de soporte M13-1GS-M13 fue 29 nM, mientras que la CI₅₀ de la matriz de soporte M13 monomérica fue 71 nM. Las CI₅₀ de las matrices de soporte M13 divalentes con conectores más largos fueron drásticamente inferiores (5-6 nM).

La FIG. 2D muestra el efecto inhibitorio de las matrices de soporte específicas para CD40L murino monovalentes (M13) o bivalentes en tándem sobre la expresión de CD86 inducida por CD40L murino en linfocitos B. Las matrices de soporte bivalentes eran aproximadamente 3 logs más potentes que las matrices de soporte monovalentes.

Las FIGS. 8A y 8B muestran que las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano 309 y 311 exhiben una mayor potencia en un formato en tándem bivalente. Las matrices de soporte bivalentes 311 (FIG. 8A) y las matrices de soporte bivalentes 309 (FIG. 8B) mostraron aproximadamente una mejora de 7 veces y 500-1000 veces, respectivamente, en la inhibición de la expresión inducida por CD40L humano en PBMC humanas positivas para CD19 estimuladas con células Jurkat D1.1. Las matrices de soporte bivalentes 309 fueron comparables en potencia al anticuerpo anti-CD40L humano monoclonal 5c8 de Biogen.

La solubilidad, estabilidad y facilidad de la purificación no se vio afectada por la adición de conectores peptídicos de longitud variable que comprendían una (1GS), tres (3GS), cinco (5GS) o siete repeticiones (7GS) "GGGGS" (remítase a la FIG. 2B).

6.4 Unión y función de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L.

5 Además de la unión bioquímica descrita anteriormente, es importante verificar que estas matrices de soporte de Tn3 novedosas eran capaces de unirse a CD40L endógeno expresado en los linfocitos T primarios después de la activación. Los linfocitos T se aislaron de múltiples donantes y se activaron tal como se ha descrito. Después de 24 horas, se incrementó la expresión de CD40L según se determinó mediante tinción con el anticuerpo monoclonal 5c8 (específico para humanos) y el anticuerpo monoclonal MR1 (específico para murinos) (los datos no se muestran). Las moléculas de matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L fueron capaces de detectar niveles comparables de expresión de CD40L a los de los anticuerpos monoclonales lo cual confirma que estas moléculas se pueden unir a la proteína nativa.

15 Una de las consecuencias funcionales de la interacción CD40L:CD40 es el incremento de las moléculas coestimuladoras en los linfocitos B (Yellin *et al.*, *J. Exp. Med.* 6:1857-1864, 1995). Las moléculas de Tn3 dirigidas a CD40L se evaluaron para determinar su capacidad de prevenir esto. Se utilizaron líneas celulares que expresaban CD40L humano o murino endógenamente (subclónicas D1.1 Jurkat o D10.G4, respectivamente) para estimular las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC). Una vez estimuladas, la activación de los linfocitos B se evaluó midiendo el porcentaje de incremento de CD86 por parte de los linfocitos B CD19+ mediante citometría de flujo. En este ensayo, los anticuerpos monoclonales de control positivo fueron capaces de inhibir el porcentaje de CD19+ de las células con expresión de CD86 con una CI_{50} de 0.170 nM (5c8) y 0.230 nM (MR1). La 342 de Tn3 optimizada específica para humanos fue capaz de antagonizar el incremento de CD86 con valores de CI_{50} = 0.700nM (n = 5 donantes) (remítase a la FIG. 10B y la TABLA 7).

25 La M31 de Tn3 optimizada específica para murinos tuvo una CI_{50} de 1.5 nM. Estos resultados similares se observaron cuando se utilizó la proteína Mega-CD40L recombinante para estimular las PBMC. Los datos experimentales demostraron que ambas moléculas, ya sea específicas para humanos o murinos, no pueden inhibir únicamente la vía de señalización principal dentro de una célula (NF κ B), sino también una de sus funciones más importantes: interacciones de linfocitos T-B. Esta acción inhibitoria puede contrarrestar la contribución de CD40L en muchas enfermedades autoinmunitarias.

30 6.5 Tn3 anti-CD40L inhiben la proliferación de linfocitos B y la diferenciación de las células plasmáticas después del cocultivo de T/B.

Las interacciones de CD40L sobre linfocitos T con linfocitos B que expresan CD40 son un aspecto fundamental de la cooperación de los linfocitos T que facilita el desarrollo de respuestas inmunitarias adaptable (Banchereau, 1994; Oxenius, 1996, van Kooten & Banchereau, 1997). Para modelar esto, las fusiones de anti-hCD40L Tn3-HSA del dímero 340, 342 y 342-342 se evaluaron en cocultivos celulares primarios de linfocitos T y linfocitos B donde los linfocitos T CD4+ humanos estimulados con anti-CD3 y tratados con mitomicina C se cultivaron con linfocitos B humanos purificados. Se midió la capacidad de los linfocitos B para proliferar el día cuatro para diferenciarse en células plasmáticas (PC) llegado el día siete y modificar su clase de anticuerpo de producción (los datos de PC y anticuerpos no se muestran) (FIG. 15) (Ettinger, 2007). La matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L 342-342-HSA fue capaz de reducir la proliferación inducida por linfocitos T en al menos un 50% en comparación con la proliferación celular de linfocitos B en ausencia de matrices de soporte o en presencia de una matriz de soporte de control no específica. La proliferación es un precursor, señal uno, de la diferenciación de las células plasmáticas, cuando se produce la ligadura CD40L:CD40. También se observaron la inhibición de la diferenciación de las células plasmáticas y el cambio de la clase de anticuerpo (no se muestran los datos).

6.6 Disrupción *in vivo* del eje CD40:CD40L.

45 La función principal de las interacciones CD40L:CD40R en respuestas inmunitarias dependientes de T ha sido debidamente caracterizada (Noelle, 1992; Renshaw, 1994, Wykes, 2003). La matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L murino M31 (M31-MSA y M31-M31-MSA) se utilizó para evaluar los efectos de estas moléculas novedosas en un modelo de inmunización dependiente de T mediante la inmunización de ratones (por vía intravenosa) el día cero con eritrocitos de oveja (SRBC).

50 Los días 9-13, se inyectó la dosis indicada de inhibidor en los ratones por vía intraperitoneal a diario y el día 14 se cuantificaron los linfocitos B en GC en los ganglios esplénicos y linfáticos. Fue necesario administrar una dosis diaria debido a la corta $T_{1/2}$ de esta molécula *in vivo*, 31 horas (FIG. 4). Se ha establecido que CD40L controla las respuestas humorales tales como la generación de centros germinales en sitios anatómicos tales como el bazo y los ganglios linfáticos a partir de los descubrimientos previos (Jacob, 1991). En la presente, se observó la disrupción de la contribución del eje CD40L:CD40 a dicha formación de una forma dependiente de la dosis con M31-MSA frente a la matriz virgen o nuestro control no específico, D1-MSA, tal como demostró el porcentaje de linfocitos B en GC.

Incluso en una concentración de 10 mg/kg, M31-MSA fue capaz de suprimir el porcentaje de linfocitos B en GC (FIG. 5B) así como también el anticuerpo monoclonal MR1 (FIG. 5A). Otras subpoblaciones de células parecían normales, incluidas las poblaciones de linfocitos T específicos, lo cual garantizaba que los resultados observados no se debían al agotamiento de linfocitos T (FIG. 5C, FIG. 5D, FIG. 5E). Además, los resultados de los datos de ELISA para anti-Ig de SRBC eran equiparables a los datos de los linfocitos B en centros germinales (FIG. 5F). Teniendo todo esto en cuenta, estos datos indicaron que la matriz de soporte de Tn3 específica para murinos M31-MSA puede anular reacciones controladas por la señalización de CD40.

De forma análoga, la matriz de soporte de Tn3 específica para CD40L humano 342 (342-HSA y 342-342-HSA) se utilizó para evaluar los efectos de estas moléculas novedosas en el modelo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T específicos para KLH (TDAR) en monos cinomólogos. En la presente, la disrupción del eje CD40L:CD40 provoca la supresión de la generación de anticuerpos para el antígeno KLH de una forma dependiente de la dosis. Tal como se muestra en las Figuras 5G y 5H, el constructo bivalente 342 suprimió los niveles de anticuerpos IgM e IgG en una concentración de 0.5 mg/kg (mpk) y se observó una supresión prácticamente total para 5 mg/kg. El constructo monomérico 342 también suprimió los niveles de IgM e IgG pero en concentraciones superiores con una supresión prácticamente total para 40 mg/kg. Estos datos indicaron que los constructos de las matrices de soporte de Tn3 específicas para humanos 342-HSA y 342-342-HSA pueden anular reacciones controladas por la señalización de CD40.

6.7 Las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano no inducen la agregación plaquetaria.

Los ensayos clínicos en humanos con anticuerpos monoclonales anti-CD40L se interrumpieron cuando se produjeron tromboembolismos en varios pacientes (Davidson *et al. Arth Rheu*, 43:S271). Los análisis preclínicos posteriores sugirieron que este era un efecto inespecífico de los anticuerpos monoclonales anti-CD40L. Por lo tanto, era importante evaluar las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano en ensayos de agregación plaquetaria.

Cuando se utilizó una proporción de tres moléculas de CD40L fisiológico respecto a una molécula del anticuerpo monoclonal anti-CD40L, se observaron efectos proagregadores en plasma rico en plaquetas (PRP) citrado, plaquetas lavadas y sangre completa (FIG. 16A). Estos efectos eran mediados por interacciones dependientes del dominio Fc del anticuerpo monoclonal posteriores a la unión de CD40L (los datos no se muestran). En ausencia de la fusión del dominio Fc, no se observó agregación. No se observó agregación en múltiples donantes con ninguna de las matrices de soporte de Tn3 específicas para CD40L humano, ya fuera como dímeros o como proteínas de fusión HSA (FIG. 16B y FIG. 16C).

Los efectos secundarios perjudiciales que se observaron en los ensayos clínicos se observaron creando un inmunocomplejo de CD40L soluble/anticuerpo monoclonal anti-CD40L en presencia de plaquetas (FIG. 16A y trazo 5C8 en la FIG. 16C). Otro ejemplo de esto se puede observar en la histología del estudio murino de FcγRIIIa humano transgénico (Francis *et al.*, 2010). Tras la administración de los complejos inmunitarios de CD40L soluble/anticuerpo monoclonal, se observó una abundancia de trombos en el tejido pulmonar minutos después de la administración. Sin embargo, cuando se duplicó con matrices de soporte de Tn3 anti-CD40L, la histología presente en el pulmón era normal de acuerdo con las muestras de control (los datos no se muestran).

Ejemplo 7

Dominios de fibronectina de tipo III modificados para unirse a CD40L: clonación, expresión, purificación, cristalización y análisis por difracción de rayos X preliminar de dos complejos.

Se cocristalizó CD40L soluble humano recombinante con dos matrices de soporte de Tn3 monoméricas específicas para CD40L, 309 y 311K4E-12, ambas aisladas como ligantes de CD40L a partir de colecciones de expresión en fagos. Los cristales se difractaron a 3.1 y 2.9 Å respectivamente. Además, se cocristalizó CD40L soluble humano recombinante con la 342 monomérica de Tn3 optimizada sola y con tanto la 342 monomérica como la 311K4E_12 monomérica. Los cristales para estas estructuras se difractaron a 2.8 y 1.9 Å respectivamente. Las estructuras cristalinas correspondientes ayudan a comprender la interacción entre las matrices de soporte de Tn3 y CD40L, y se pueden utilizar para diseñar ligantes de CD40L con una afinidad mayor y constructos en tándem que se unen a múltiples epítopos.

7.1 Expresión y purificación de moléculas de Tn3 y CD40L soluble humano

Para producir moléculas de Tn3 sin marcadores para la cristalización, las proteínas se expresaron en *E. coli* utilizando un vector inducible por IPTG de fabricación interna diseñado para secretar proteínas expresadas recombinantemente en el espacio periplásmico. Este vector tiene un promotor Ptac, una mutación L25/M en el péptido señal OppA (MTNITKRSLVAAGVLAALMAGNVAMA) (SEQ ID NO: 210), un marcador 8xHis carboxiterminal además de un sitio de escisión con trombina. Las secuencias de Tn3 se subclonaron entre el péptido señal y el sitio de escisión con trombina.

Las proteínas marcadas con His secretadas expresadas se purificaron utilizando una resina Ni-NTA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, California, EE. UU.), y posteriormente se escindieron con trombina

seguida de una nueva purificación por afinidad con Ni-NTA para eliminar la proteína intacta sin cortar y el fragmento marcado con His cortado. Este paso de purificación fue seguido de un paso de intercambio iónico utilizando columnas HiTrap Q (GE Healthcare, Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.) llevado a cabo en un purificador Äkta (GE Healthcare, Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.). Las proteínas Tn3 sin marcar purificadas muestran una pureza superior al 95% y homogeneidad sobre la base de los resultados de SDS-PAGE y SEC.

El gen CD40L soluble humano (113-261, UNIPROT: P29965) se sintetizó mediante GeneArt con un marcador 6xHis aminoterminal y se clonó en un vector de expresión de mamífero interno bajo el control del mayor promotor temprano inmediato de citomegalovirus (hCMVie) (Boshart *et al.*, Cell 41: 521-530, 1985). El gen CD40L se clonó en marco con un péptido señal CD33. Los genes EBNA y Ori P en el vector se utilizaron para incrementar la expresión proteica. El gen CD40L también incorporaba una secuencia poli-A SV40 para permitir el procesamiento adecuado de su ARNm en el extremo 3'. El constructo se transfirió de forma transitoria en células en suspensión 293F (células renales embrionarias humanas [HEK] cultivadas en medio 293 Freestyle y utilizando 293 Fectin, Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.). Las células se cultivaron utilizando un protocolo estándar y el medio se recogió después de 4 y 8 días. La proteína CD40L soluble se purificó a continuación utilizando una resina Ni-NTA seguida de un paso de intercambio iónico utilizando una columna Hi-Trap SP FF (GE Healthcare, Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.) y diálisis frente a Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM.

Para preparar los complejos, la molécula de Tn3, ya sea 309 o 311K4E_12 o 342, se mezcló con CD40L en una proporción de 1.1:1, se concentró utilizando concentradores Vivaspin (punto de inflexión de 30 000 Da; GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, EE. UU.) hasta aproximadamente 10 mg/ml y se sometió a cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) utilizando una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.) preequilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, Na₂S₂O₃ al 0.02% (FIG. 19, panel A). Después del paso de separación, el complejo se concentró hasta 18 mg/ml y se sometió a cristalización. El complejo 342-311K4E_12-CD40L se preparó esencialmente como se describió anteriormente utilizando una proporción 1.1:1.1:1 de los tres componentes.

7.2 Criba y optimización de la cristalización

Se prepararon experimentos de cristalización en gota sentada en placas Intelli de 96 pocillos (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, California, EE. UU.) utilizando un robot de cristalización Phoenix (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, California, EE. UU.) mezclando volúmenes de 300 nL de solución del pocillo y solución del complejo proteico en el compartimento de la gota y dejando que se equilibre frente a 50 µL de solución del pocillo. Se utilizaron tamices de cristalización comerciales de Hampton Research (Aliso Viejo, California, EE. UU.), Emerald BioSystems (Bainbridge Island, Washington, EE. UU.) y Molecular Dimensions (Apopka, Florida, EE. UU.).

La cristalización de cada uno de los complejos 309-CD40L, 342-CD40L y 342-311K4E_12-CD40L requirió un paso de optimización que incluía una criba adicional utilizando un tamiz aditivo HT (Hampton Research, Aliso Viejo, California, EE. UU.). En el paso de optimización, la solución del pocillo de la placa de 96 pocillos se rellenó con un 80% de solución seleccionada en la criba inicial y un 20% del aditivo respectivo. La gota fue de 300 nL de solución de proteína y 300 nL de la nueva solución del pocillo después de mezclar exhaustivamente esta última. Se recogieron los cristales con calidad de difracción directamente de las placas de 96 pocillos. Para la crioconservación, el cristal se transfirió a tres soluciones consecutivas de aguas madres con concentraciones crecientes de glicerol.

Los cristales de 311-CD40L con calidad de difracción se cultivaron en el tamiz inicial a partir de la solución que no requirió adición de agente criogénico.

7.3 Difracción de rayos X y recopilación de datos

Se obtuvieron los patrones de difracción de rayos X para el complejo de 309-CD40L a partir de un monocristal en el generador de haces 5.0.3 de Advanced Light Source en el Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley (Universidad de California, Berkeley) equipado con un detector de rayos X ADSC Q315R CCD (Area Detector Systems Corporation, Poway, California, EE. UU.). Se registraron 360 imágenes consecutivas con un rango de oscilación de 0.5°, a una distancia entre el cristal y el detector de 300 mm, y con un tiempo de exposición de 0.8 segundos.

Se registraron los patrones de difracción de rayos X para los complejos 311K4E_12-CD40L, 342-CD40L y 342-311K4E_12-CD40L a partir de monocristales en el generador de haces 31-ID-D de Advanced Photon Source en el Laboratorio Nacional Argonne (Universidad de Chicago, Chicago, IL) equipado con un detector Rayonix 225 HE (Rayonix LLC, Evanston, Illinois, EE. UU.). Se registraron 180 imágenes consecutivas con un rango de oscilación de 1°, a una distancia entre el cristal y el detector de 300 mm, y con un tiempo de exposición de 0.8 segundos.

La reducción y el ajuste de la escala de todos los datos se realizaron utilizando un paquete HKL2000 (Otwinowski & Minor, Methods in Enzymology, 276:307-326. 1997).

7.4 Resultados y discusión

5 La condición de cristalización más reproducible del complejo 309-CD40L resultó ser B5 (NaNO₃ 0.2 M, PEG3350 al 20%) en el tamiz Peg/Ion (Hampton Research). Una optimización adicional con tamiz aditivo proporcionó un cristal con calidad de difracción a partir de la condición A1 (BaC₁₂·2H₂O 0.1 M). El cristal que se muestra en la FIG. 19, panel B, se recogió de una placa de 96 pocillos y se enfrió en nitrógeno líquido después de transferirlo a la solución de aguas madre suplementada con glicerol al 20%.

Simetría del grupo espacial: El cristal pertenecía al grupo espacial ortorrómbico P2₁2₁2₁ con unos parámetros de celda de a=85.69 Å, b=90.64 Å, c=95.56 Å y difractaba a 3.1 Å. Cabe esperar que la unidad asimétrica contenga un trímero de CD40L y tres moléculas de 309 con un valor de VM de aproximadamente 2.3 Å³/Da.

10 Para la cristalización de 311K4E_12-CD40L, el tamiz Cryo I & II (Emerald BioStructures) proporcionó varias condiciones que no requerían optimización ni crioconservación. Se utilizó un monocristal (FIG. 19, panel C) de la condición F7 (PEG 600 al 40%, CH₃COONa 0.1 M, MgCl₂ 0.2 M) para la recopilación de los datos.

15 Simetría del grupo espacial: El cristal pertenecía al grupo espacial cúbico P2₁3 con unos parámetros de celda de 97.62 Å y difractaba a 2.6 Å. La unidad asimétrica contiene un CD40L y una molécula de 311K4E_12 con un valor de VM de aproximadamente 2.9 Å³/Da.

Simetría del grupo espacial 342-CD40L: El cristal pertenecía al grupo espacial P321 con unos parámetros de celda de a=93.53 Å, b=93.53 Å, c=66.69 Å, resolución= 2.8 Å. La unidad asimétrica contiene un monómero CD40L y un monómero 342.

20 Simetría del grupo espacial 342-311K4E_12-CD40L: El cristal pertenecía al grupo espacial P2₁ con unos parámetros de celda de a=80.32 Å, b=143.48 Å, c=111.27 Å, β=98.22°, resolución= 1.9 Å. La unidad asimétrica contiene dos trímeros CD40, seis monómeros 342 y seis monómeros 311K4E-12.

Los datos estadísticos para todas las estructuras se muestran en la TABLA 10.

TABLA 10. Datos estadísticos de la recopilación de datos de rayos X.

	309-CD40L	311K4E-12
Longitud de onda, Å	0.9793	0.9793
Resolución, Å	50.0-3.05 (3.16-3.05) ^a	50.0-2.94
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 3
Parámetros de celda, Å	a=85.69, b=90.64, c=95.56	a=97.62
Reflexiones totales	94 024	128 140
Reflexiones únicas	14 555	6720
Redundancia media	6.5 (6.4) ^a	19.2 (19.7)
Integridad, %	100.0 (100.0) ^a	99.4 (100.0)
R _{sim}	0.097 (0.443) ^a	0.114 (0.785)
Media I/σ (I)	17.2 (4.6) ^a	20.1 (2.4)

^a Los valores entre paréntesis corresponden a la cubierta de resolución más elevada

	342-CD40L	342-311K4E_12-CD40L
Longitud de onda, Å	0.9793	0.9793
Resolución, Å	50.0-2.8 (2.83-2.82) ^a	144.5-1.9 (1.96-1.95) ^a
Grupo espacial	P321	P2 ₁
Parámetros de celda, Å	a=93.53, b=93.53, c=66.69	a=80.32, b=143.48, c=111.27, β=98.22°

Reflexiones totales	66 038 (549) ^a	733 814 (1806) ^a
Reflexiones únicas	8406 (88) ^a	179 232 (1806) ^a
Redundancia media	7.9 (6.2) ^a	4.1 (4.2) ^a
Integridad, %	99.9 (100.0) ^a	99.7 (99.6) ^a
R _{sim}	0.19 (0.79) ^a	0.06 (0.57) ^a
Media I/σ (I)	8.1 (1.4) ^a	14.5 (3.0) ^a

^a Los valores entre paréntesis corresponden a la cubierta de resolución más elevada

El CD40L formó un trímero (polipéptidos A, B y C en la FIG. 17A). Cada matriz de soporte de Tn3 309 (polipéptidos D, E y F en la FIG. 17A) estaba en contacto con dos polipéptidos CD40L. La estructura cristalina reveló que hay seis contactos específicos entre cada matriz de soporte 309 y el primer y el segundo polipéptido CD40L. El ácido aspártico 17 en el BC está en contacto con la treonina 251 en el primer CD40L. El ácido glutámico 18 en el bucle BC está en contacto con la arginina 203 en el primer CD40L y con la isoleucina 204 en el segundo CD40L. La serina 47 en el bucle DE está en contacto con la histidina 249 en el primer CD40L. El triptófano 49 en el bucle DE está en contacto con la valina 247 en el primer CD40L. El ácido aspártico 70 en el bucle FG está en contacto con la serina 185 en el segundo CD40L (remítase a la FIG. 17A). Los residuos aminoacídicos de CD40L que están en contacto con la matriz de soporte 311 también se muestran en la FIG. 18A.

En el caso de 309, cada matriz de soporte monomérica 311K4E_12 (polipéptidos A, B y C en la FIG. 17B) está en contacto con dos polipéptidos CD40L. La estructura cristalina reveló que hay 19 contactos específicos entre cada matriz de soporte 311K4E_12 y el primer y el segundo polipéptido CD40L. La asparagina 17 en el bucle BC está en contacto con la tirosina 146 y el ácido glutámico 142 en el primer CD40L. La arginina 18 en el bucle BC está en contacto con el ácido glutámico 142, la tirosina 146 y la metionina 148 en el primer CD40L. La serina 22 en el bucle BC está en contacto con el ácido glutámico 142 y la leucina 155 en el primer CD40L. La serina 22 en el bucle BC está en contacto con la asparagina 151 en el primer CD40L. La histidina 15 en el bucle BC está en contacto con la tirosina 146 en el primer CD40L y con el ácido glutámico 230 en el segundo CD40L. La valina 50 en el bucle DE está en contacto con el ácido glutámico 230 en el segundo CD40L. La región aminoterminal de la matriz de soporte monomérica 311K4E_12 está conectada con el segundo CD40L. La arginina 200 en el segundo CD40L está en contacto con la treonina 7, el ácido aspártico 8 y la treonina 10 en la región aminoterminal de 311K4E_12. La arginina 203 en el segundo CD40L está en contacto con el ácido glutámico 4 y el ácido aspártico 5. Los residuos aminoacídicos de CD40L que están en contacto con la matriz de soporte 309 también se muestran en la FIG. 18B.

Las estructuras cristalinas de CD40L en los complejos con 309 y 311K4E_12 mostraron que las matrices de soporte monoméricas 311K4E_12 y 309 se unen a epítomos diferentes situados en partes diferentes del complejo trimérico de CD40L (FIG. 17C). Las estructuras mostraron que ambas matrices de soporte se unen en el mismo surco que interaccionaría con el receptor CD40.

La estructura cristalina de una 342 con CD40L se proporciona en la Figura 17D y muestra que aunque 342 se une a la misma parte de CD40L, se observan cambios específicos en CD40L en los residuos que están en contacto en comparación con el clon 309 original. Específicamente, en 342 el aspartato 18 en el bucle BC está en contacto con la treonina 251 de CD40L y la histidina 47 del bucle DE está en contacto con la histidina 249 de CD40L, la histidina 48 del bucle DE está en contacto con la histidina 249, la serina 245 y la serina 248 de CD40L, y la histidina 50 del bucle DE está en contacto con la valina 247 de CD40L.

La estructura cristalina de una 342 y una 311K4E_12 con CD40L demuestra que ambas matrices de soporte se pueden unir simultáneamente a sus epítomos respectivos que están situados en partes diferentes del complejo trimérico CD40L (FIG 17E). Se mantienen los contactos para cada una de las matrices de soporte independientes (descritos anteriormente).

Los ejemplos que se muestran anteriormente ilustran varios aspectos de la invención y la práctica de los métodos de la invención. No se pretende que estos ejemplos proporcionen una descripción exhaustiva de los numerosos aspectos diferentes de la descripción.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

CD40L sp|P29965|CD40L_HUMANO – Forma de membrana

Dominio citoplasmático = 1-20

ES 2 819 075 T3

Región de la proteína de membrana de tipo II con señal de anclaje = 21-46

Forma soluble = 113-261

MIETYNQTSRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH
EDFVFMKTIQRRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNP
5 QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN
REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN
VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL

SEQ ID NO. 2

CD40L– Forma soluble, corresponde también al constructo cocrystalizado

10 MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQ
PGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL

SEQ ID No: 3

Tn3 (con bucles no modificados)

15 IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTGKIDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDE
YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 4

3.^{er} FnIII de tenascina C, bucle AB (Tn3)

KDVTDTT

20 SEQ ID NO. 5

3.^{er} FnIII de tenascina C, bucle BC (Tn3)

FKPLAEIDG

SEQ ID NO. 6

3.^{er} FnIII de tenascina C, bucle CD (Tn3)

25 KDVPGDR

SEQ ID NO. 7

3.^{er} FnIII de tenascina C, bucle DE (Tn3)

TEDENQ

SEQ ID NO. 8

30 3.^{er} FnIII de tenascina C, bucle EF (Tn3)

GNLKPDE

SEQ ID NO. 9

3.^{er} FnIII de tenascina C, bucle FG (Tn3); también en los clones 309FGwt, 340,341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348 y 349

35 RRGDMSSNPA

SEQ ID NO. 10

3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta A (Tn3)

RLDAPSQIEV

SEQ ID NO. 11

3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta A (Tn3) truncación N-terminal

5 IEV

SEQ ID NO. 12

3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta B (Tn3)

ALITW

SEQ ID NO. 13

10 3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta C (variante de Tn3)

CELAYGI

SEQ ID NO. 14

3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta C (Tn3)

CELTYGI

15 SEQ ID NO. 15

3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta D (Tn3)

TTIDL

SEQ ID NO. 16

3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta E (Tn3)

20 YSI

SEQ ID NO. 17

3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta F (Tn3)

YEVSLIC

SEQ ID NO. 18

25 3.^{er} FnIII de tenascina C, hebra beta G (Tn3)

KETFTT

SEQ ID NO. 19

Clon 309 - Clon original aislado de la colección de Tn3 virgen

AIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCCELTYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT

30 EYEVSLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 20

Clon 309 - Clon original aislado de la colección de Tn3 virgen (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCCELTYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDE

YEVSLICYTDQEAGNPAKETFTT

35 SEQ ID NO. 21

ES 2 819 075 T3

Clon 309FGwt - Clon original con un bucle FG "humanizado"

AIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 22

5 Clon 309FGwt - Clon original con un bucle FG "humanizado" (sin A N-term ni conector C-term ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 23

Clon 340 - Variante con afinidad madura

10 AIEVKDVTDTTALITWSDDFDNYEWCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 24

Clon 340 - Variante con afinidad madura (sin A N-term ni conector C-term ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWSDDFDNYEWCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDE

15 YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 25

Clon 341 - Variante con afinidad madura

AIEVKDVTDTTALITWSDDFADYVWCELYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

20 SEQ ID NO. 26

Clon 341 - Variante con afinidad madura (sin A N-term ni conector C-term ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWSDDFADYVWCELYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 27

25 Clon 342 - Variante con afinidad madura (con un bucle FG WT)

AIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDT

EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 28

Clon 342 - Variante con afinidad madura (con un bucle FG WT; sin A N-term ni conector C-term ni marcador His8)

30 IEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDE

YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 29

Clon 343 - Variante con afinidad madura

AIEVKDVTDTTALITWLDDWGSYHVCETYGIKDVPGDRTTIDLWYHQAWYSIGNLKPDT

35 EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 30

ES 2 819 075 T3

Clon 343 - Variante con afinidad madura (sin A N-term ni conector C-term ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWLDDWGSYHVCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWYHQAWYSIGNLKPDE
YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 31

5 Clon 344 - Variante con afinidad madura

AIEVKDVTDTTALITWSDEVDYVVCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT
EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 32

Clon 344 - Variante con afinidad madura (sin A N-term ni conector C-term ni marcador His8)

10 IEVKDVTDTTALITWSDEVDYVVCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDE
YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 33

Clon 345 - Variante con afinidad madura

AIEVKDVTDTTALITWSDDFAEYVGCCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
15 EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 34

Clon 345 - Variante con afinidad madura (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWSDDFAEYVGCCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDE
YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

20 SEQ ID NO. 35

Clon 346 - Variante con afinidad madura

AIEVKDVTDTTALITWSDDFEEYVVCCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 36

25 Clon 346 - Variante con afinidad madura (sin A N-term ni conector C-term ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWSDDFEEYVVCCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDE
YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 37

Clon 347 - Variante con afinidad madura

30 AIEVKDVTDTTALITWSDEVGQYVGCCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT
EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 38

Clon 347 - Variante con afinidad madura (sin A N-term ni conector C-term ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWSDEVGQYVGCCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDE
35 YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

ES 2 819 075 T3

SEQ ID NO. 39

Clon 348 - Variante con afinidad madura

AIEVKDVTDTTALITWSDDIGLYVWCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWFHQAWYSIGNLKPDT
EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

5 SEQ ID NO. 40

Clon 348 - Variante con afinidad madura (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWSDDIGLYVWCELTYGIKDVPGDRRTTIDLWFHQAWYSIGNLKPDE
YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 41

10 Clon 349 - Variante con afinidad madura

AIEVKDVTDTTALITWSDEHAEFIGELTYGIKDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
EYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 42

Clon 349 - Variante con afinidad madura (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

15 IEVKDVTDTTALITWSDEHAEFIGELTYGIKDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDE
YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 43

Clon 311 - Clon original aislado de la colección de Tn3 virgen

AIEVKDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELTYGIKDVPGDRRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP

20 DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 44

Clon 311 - Clon original aislado de la colección de Tn3 virgen (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVKDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELTYGIKDVPGDRRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

25 SEQ ID NO. 45

Clon 311K4E - Variante de la primera ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELTYGIKDVPGDRRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP

DTEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 46

30 Clon 311K4E - Variante de la primera ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELTYGIKDVPGDRRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTDDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 47

35 Clon 311K4E_1 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVTDTTALITWINRSYYADLHGCELTYGIKDVPGDRRTTIDLQIYVHYSIGNLKP

DTKYEVSILICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 48

Clon 311K4E_1 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

5 IEVEDVDTTALITWINRSYYADLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLQIYVHYSIGNLKP

TKYEVSILICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 49

Clon 311K4E_2 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad AIEVEDVDTTALITWTNRSSYSHLDGCELTYGIKDVPGDRTTIDLSAAIYVHYSIGNLK

10 PDTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 50

Clon 311K4E_2 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8) IEVEDVDTTALITWTNRSSYSHLDGCELTYGIKDVPGDRTTIDLSAAIYVHYSIGNLKP

DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

15 SEQ ID NO. 51

Clon 311K4E_3 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWINRSSYHNFPHCCELAYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 52

20 Clon 311K4E_3 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8) IEVEDVDTTALITWINRSSYHNFPHCCELAYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 53

Clon 311K4E_4 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

25 AIEVEDVDTTALITWTNRSSYSNHLGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNNIYVHYSIGNLKP

DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 54

Clon 311K4E_4 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

30 IEVEDVDTTALITWTNRSSYSNHLGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNNIYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 55

Clon 311K4E_5 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWTNRSSYSNHFHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

35 DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 56

Clon 311K4E_5 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTNRSSYSNFHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT
SEQ ID NO. 57

Clon 311K4E_7 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

5 AIEVEDVDTTALITWTNRSFYSLHGCELTGDIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH
SEQ ID NO. 58

Clon 311K4E_7 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

10 IEVEDVDTTALITWTNRSFYSLHGCELTGDIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT
SEQ ID NO. 59

Clon 311K4E_8 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWTNRSSYAYLHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
15 DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH
SEQ ID NO. 60

Clon 311K4E_8 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTNRSSYAYLHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
20 TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT
SEQ ID NO. 61

Clon 311K4E_9 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWINRSSYANLHGCELTGDIKDVPDRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH
25 SEQ ID NO. 62

Clon 311K4E_9 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWINRSSYANLHGCELTGDIKDVPDRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT
30 SEQ ID NO. 63

Clon 311K4E_10 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWTNRSSYANYHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH
SEQ ID NO. 64

35 Clon 311K4E_10 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTNRSSYANYHGCELAYGIKDVPDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 65

Clon 311K4E_11 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWTRSSYANLPGCELTGKIDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

5 DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 66

Clon 311K4E_11 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTRSSYANLPGCELTGKIDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

10 TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 67

Clon 311K4E_12 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWTRSSYSNLHGCELAYGKIDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP

DTEYEVSLICLTTDGTYNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

15 SEQ ID NO. 68

Clon 311K4E_12 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTRSSYSNLHGCELAYGKIDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTTDGTYNPAKETFTT

20 SEQ ID NO. 69

Clon 311K4E_13 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWINRSSYANLHGCELTGKIDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 70

25 Clon 311K4E_13 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWINRSSYANLHGCELTGKIDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 71

30 Clon 311K4E_14 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWTARSAYSHHHYCELTGKIDVPGDRTTIDLRQPYVHYSIGNLKP

DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 72

35 Clon 311K4E_14 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTARSAYSHHHYCELTGKIDVPGDRTTIDLRQPYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

ES 2 819 075 T3

SEQ ID NO. 73

Clon 311K4E_15 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad
AIEVEDVDTTALITWTNRSSYANYHHCELTYGIKDVPDRTTIDLELYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

5 SEQ ID NO. 74

Clon 311K4E_15 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTNRSSYANYHHCELTYGIKDVPDRTTIDLELYVHYSIGNLKPDT
EYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

10 SEQ ID NO. 75

Clon 311K4E_16 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad
AIEVEDVDTTALITWTNRSSYSDLPGCELTYGIKDVPDRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 76

15 Clon 311K4E_16 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTNRSSYSDLPGCELTYGIKDVPDRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 77

20 Clon 311K4E_19 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

AIEVEDVDTTALITWTHRSAYSNHSFCELTYGIKDVPDRTTIDLNTPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 78

25 Clon 311K4E_19 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

IEVEDVDTTALITWTHRSAYSNHSFCELTYGIKDVPDRTTIDLNTPYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 79

Clon 311K4E_20 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad

30 AIEVEDVDTTALITWTNRSLYANFHGCELTYGIKDVPDRTTIDLEQVYVHYSIGNLKP
DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

SEQ ID NO. 80

Clon 311K4E_20 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)

35 IEVEDVDTTALITWTNRSLYANFHGCELTYGIKDVPDRTTIDLEQVYVHYSIGNLKP

TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 81

ES 2 819 075 T3

Clon 311K4E_21 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad
AIEVEDVDTTALITWTNRSSYSNLPGCELTYGIKDVPDRTTIDLNQVYVHYSIGNLKP
DTEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH
SEQ ID NO. 82

5 Clon 311K4E_21 - Variante clónica de la segunda ronda de maduración de la afinidad (sin A N-term, ni conector C-term, ni marcador His8)
IEVEDVDTTALITWTNRSSYSNLPGCELTYGIKDVPDRTTIDLNQVYVHYSIGNLKP
TEYEVSLICLTTDGTYSNPAKETFTT
SEQ ID NO. 83

10 Clon 309 y 309FGwt - bucle BC
SDEFGHYDG
SEQ ID NO. 84

Clon 340 - bucle BC
SDDFDNYEW

15 SEQ ID NO. 85
Clon 341 - bucle BC
SDDFADYVW

SEQ ID NO. 86
Clon 342 - bucle BC

20 SDDFGEYVW
SEQ ID NO. 87
Clon 343 - bucle BC

LDDWGSYHV
SEQ ID NO. 88

25 Clon 344 - bucle BC
SDEVDYVW
SEQ ID NO. 89

Clon 345 - bucle BC
SDDFAEYVG

30 SEQ ID NO. 90
Clon 346 - bucle BC
SDDFEEYVW

SEQ ID NO. 91
Clon 347 - bucle BC

35 SDEVGQYVG
SEQ ID NO. 92

Clon 348 - bucle BC
SDDIGLYVW
SEQ ID NO. 93
Clon 349 - bucle BC
5 SDEHAFIG
SEQ ID NO. 94
Clon 309, 309FGwt, 341, 345, 346, 349 – bucle DE
WWHSAW
SEQ ID NO. 95
10 Clon 340, 344, 347 – bucle DE
WYHMAW
SEQ ID NO. 96
Clon 342 - bucle DE
WYHHAH
15 SEQ ID NO. 97
Clon 343 - bucle DE
WYHQAW
SEQ ID NO. 98
Clon 348 - bucle DE
20 WFHQAW
SEQ ID NO. 99
Clon 309 - bucle FG
YTDQEAGNPA
SEQ ID NO. 100
25 Clon 311, 311K4E - bucle BC
TNRSSYYNLHG
SEQ ID NO. 101
Clon 311K4E_1 - bucle BC
INRSYYADLHG
30 SEQ ID NO. 102
Clon 311K4E_2 - bucle BC
TNRSSYSHLDG
SEQ ID NO. 103
Clon 311K4E_3 - bucle BC
35 INRSYHNFPH

SEQ ID NO. 104
Clon 311K4E_4 - bucle BC
TNRSSYSNHLG
SEQ ID NO. 105
5 Clon 311K4E_5 - bucle BC
TNRSSYSNFHG
SEQ ID NO. 106
Clon 311K4E_7 - bucle BC
TNRSFYSNLHG
10 SEQ ID NO. 107
Clon 311K4E_8 - bucle BC
TNRSSYAYLHG
SEQ ID NO. 108
Clon 311K4E_9, 311K4E_13 - bucle BC
15 INRSSYANLHG
SEQ ID NO. 109
Clon 311K4E_10 - bucle BC
TNRSSYANYHG
SEQ ID NO. 110
20 Clon 311K4E_11 - bucle BC
TNRSSYANLPG
SEQ ID NO. 111
Clon 311K4E_12 - bucle BC
TNRSSYSNLHG
25 SEQ ID NO. 112
Clon 311K4E_14 - bucle BC
TARSAYSHHHY
SEQ ID NO. 113
Clon 311K4E_15 - bucle BC
30 TNRSSYANYHH
SEQ ID NO. 114
Clon 311K4E_16 - bucle BC
TNRSSYSDLPG
SEQ ID NO. 115
35 Clon 311K4E_19 - bucle BC

THRSAYSNHSF

SEQ ID NO. 116

Clon 311K4E_20 - bucle BC

TNRSLYANFHG

5 SEQ ID NO. 117

Clon 311K4E_21 - bucle BC

TNRSSYSNLPG

SEQ ID NO. 118

Clon 311, 311K4E, 311K4E_9, 311K4E_16 - bucle DE

10 SSPYVH

SEQ ID NO. 119

Clon 311K4E_1 - bucle DE

DQIYVH

SEQ ID NO. 120

15 Clon 311K4E_2 - bucle DE

SAAIYVH

SEQ ID NO. 121

Clon 311K4E_3, 311K4E_5, 311K4E_11, 311K4E_13 - bucle DE

NSPYVH

20 SEQ ID NO. 122

Clon 311K4E_4 - bucle DE

NNIYVH

SEQ ID NO. 123

Clon 311K4E_7, 311K4E_8, 311K4E_10, 311K4E_12 - bucle DE

25 NQPYVH

SEQ ID NO. 124

Clon 311K4E_14 - bucle DE

RQPYVH

SEQ ID NO. 125

30 Clon 311K4E_15 - bucle DE

ELYVH

SEQ ID NO. 126

Clon 311K4E_19 - bucle DE

NTPYVH

35 SEQ ID NO. 127

ES 2 819 075 T3

Clon 311K4E_20 - bucle DE

EQVYVH

SEQ ID NO. 128

Clon 311K4E_21 - bucle DE

5 NQVYVH

SEQ ID NO. 129

Clon 311, 311K4E, 311K4E_1, 311K4E_2,311K4E_3, 311K4E_4, 311K4E_5, 311K4E_7, 311K4E_8, 311K4E_9, 311K4E_10, 311K4E_11, 311K4E_13,311K4E_14, 311K4E_15, 311K4E_16, 311K4E_19, 311K4E_20, 311K4E_21 - bucle FG

10 LTTDGTYSNPA

SEQ ID NO. 130

Clon 311K4E_12 - bucle FG

LTTDGTYNPA

SEQ ID NO. 131

15 Conector 2GS – (Gly4Ser)2

GGGGSGGGGS

SEQ ID NO. 132

Conector 3GS – (Gly4Ser)3

GGGGSGGGGSGGGGS

20 SEQ ID NO. 133

Mutante C34S de HSA

la localización de la mutación de Cys->Ser está subrayada

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI¹FAQYLQQSPFEDHVKL²VNEVTEFAKTCVADES³AE

NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA⁴KQEPERNECFLQHKDDNP⁵NLPRLV⁶RPEV

25 DVMCTAFHDNEETFLKKYLYE⁷IARRHPYFYAP⁸PELLFFAKRYKAA⁹FTECCQAADKAA¹⁰CLLP

KLDEL¹¹RDEGKASSAKQRLK¹²CASLQKFG¹³ERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV¹⁴DTLK

VHTEC¹⁵CHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA

DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY¹⁶EYARRHPDYSV¹⁷LLLLRLAKTYETTLEK¹⁸C

CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL¹⁹IKQNC²⁰ELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVST

30 PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES

LVNRRPCFSALEVD²¹ETYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKAT

KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDK²²ETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO. 134

342-2GS-HSAC34S - Constructo monovalente

35 HSAC34S está subrayado

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDR²³TTIDLWYHHAHYSIGNLKP²⁴D

TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR
HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQK
5 FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
FLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ
NLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR
MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
10 TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO. 135

342-3GS-342-2GS-HSAC34S Constructo bivalente

HSA está subrayado

15 SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRRTIDLWYHHAHYSIGNLKP
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRDLAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRRTIDLWYHHAHYSIGNLKP
TEYEVSLICRSGDMS
SNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQSPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
20 CFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD
YSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGE
25 YKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

SEQ ID NO. 136

30 Variante E N-terminal del bucle AB de la familia de clones 311

EDVDTT

SEQ ID NO. 137

Variante K C-terminal del bucle EF de la familia de clones 311

GNLKPDTK

35 SEQ ID NO. 138

ES 2 819 075 T3

HSA humana completa

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE
IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA
CLLP
5 KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERA
FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK
VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSIS
SKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL
YFYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKC
CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC
ELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMP
CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT
KCCTES
10 LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKAT
KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF
AEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO. 139

Variante del bucle FG de 309 (mutante RR->RS); puede estar presente en 342 constructos

RSGDMSSNPA

15 SEQ ID NO. 140

Conector 2GX – (Gly4X)₂; X = Ala, Gly, Leu, Ile, Val

GGGGXGGGGX

SEQ ID NO. 141

20 Conector 3GX – (Gly4X)₃; X = Ala, Gly, Leu, Ile, Val

GGGGXGGGGXGGGGX

SEQ ID NO. 142

Conector G10 – (Gly4Gly)₂

GGGGGGGGGG

25 SEQ ID NO. 143

Conector G15 – (Gly4Gly)₃

GGGGGGGGGGGGGGGG

SEQ ID NO. 144

342-G10-HSAC34S - Constructo monovalente 2 – Conectores todo Gly

30 HSA está subrayado

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKP
DTEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE
IARR
35 HPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQK

FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS_{KLV}TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
ENQDSISSK_{LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD_{VCKNYAEAKDV}}
FLGMFLYEYARRHPDYSV_{LLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ}
NLIKQNC_{ELFEQLGEYKFQ}NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR
5 MPCAEDYLSV_{VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE}
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE
TCFAEEGK_{LVAASQAALGL}

SEQ ID NO. 145

342-G15-342-G10-HSAC34S Constructo bivalente 2 – Conectores todo Gly

10 HSA está subrayado

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKP
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDEYEVSLICRSGDMS
SNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI_{AFAYLQQSPFEDHV}

15 KLVNEVTEFAKTCVADESAENC_{DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA}KQEPERNE
CFLQHKDDNP_{NLPR}LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAA_{FT}EECCQAADKAACL_{PKLDEL}RDEGKASSAKQRLK_{CASLQK}FGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVS_{KLV}TDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK_{LKECCE}
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD_{VCKNYAEAKDV}FLGMFLYEYARRHPD
20 YSV_{LLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ}NLIKQNC_{ELFEQLGE}
YKFQ_{NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR}MPCAEDYLSV_{VLNQL}
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGK_{LVAASQ}
AALGL

25 SEQ ID NO. 146

Clon 342 - Variante con afinidad madura (con la variante del bucle FG RR->RS subrayada)

IEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKP
DEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 147

30 Módulo conector Gly-Ser, **(G₄S)_n** donde n = 1-7; se muestra el módulo (G₄S)_n donde n=1

GGGGS

SEQ ID NO. 148

Módulo conector Gly, **(G₅)_n** donde n = 1-7; se muestra el módulo (G₅)_n donde n=1

GGGGG

35 SEQ ID NO. 149

ES 2 819 075 T3

Módulo conector Gly-Ala, (**G₄A**)_n donde n = 1-7; se muestra el módulo (G₄A)_n donde n=1

GGGGA

SEQ ID NO. 150

5 Marcador de polihistidina (**H₈**) - Un componente opcional de las matrices de soporte de Tn3 útil para la purificación se puede combinar con residuos conectores adicionales.

HHHHHHHH

SEQ ID NO. 151

Conector-marcador de polihistidina - Un componente opcional de las matrices de soporte de Tn3 útil para la purificación

GGGGSHHHHHHHH

10 SEQ ID NO. 152

MSA madura natural

EAHKSEIAHRYNDLGEQHF¹KGLVLI²AFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAA
NCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEA
EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTP
15 KLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTK
VNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLSEVEHDTMPA
DLPAAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVLLLLRLAKKYEATLEKC
CAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVST
PTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGS
20 LVERRPCFSALTVEDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKAT
AEQLKTMDDFAQFLDTCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA

SEQ ID NO. 153

Mutante en Cys de MSA madura-C34S/C579S; residuos mutados subrayados

25 EAHKSEIAHRYNDLGEQHF¹KGLVLI²AFSQYLQKSSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAA
NCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEA
EAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTP
KLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTK
VNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLSEVEHDTMPA
DLPAAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVLLLLRLAKKYEATLEKC
30 CAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVST
PTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGS
LVERRPCFSALTVEDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKAT
AEQLKTMDDFAQFLDTCKAADKDTCFSTEGPNLVTRSKDALA

SEQ ID NO. 154

35 Clon M13; los bucles BC, DE, FG están subrayados

IEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELTYGIKDVPGDRTTIDLPDHFHNYSIGNLKPDT

EYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 155

Clon M13N49Q; mutación N49Q subrayada

IEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELTGKIDVPGDRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDT

5 EYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 156

M13N49Q-1GS-M13N49Q Constructo bivalente; mutación N49Q subrayada

SQIEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELTGKIDVPGDRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDT

TEYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTTTGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWHDAFGY

10 DFGCELTGKIDVPGDRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDTTEYEVSLICANDHGFDSNPAKET
FTT

SEQ ID NO. 157

M13N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S constructo monovalente; mutaciones subrayadas

SQIEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELTGKIDVPGDRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDT

15 TEYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTTTGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHF

KGLVLIASFQYLQKSSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPN

LRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYL

HEVARRHPYFYAPELLYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMK

CSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAE

20 LAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNY

AEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQP

LVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEARNLGRVGTKCCT

LPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVP

KEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCC

25 KAADKDTCFSTEGPNLVTRSKDALA

SEQ ID NO. 158

M13N49Q-1GS-M13N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S constructo bivalente; mutaciones subrayadas

SQIEVKDVTDTTALITWHDAFGYDFGCELTGKIDVPGDRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDT

TEYEVSLICANDHGFDSNPAKETFTTTGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWHDAFGY

30 DFGCELTGKIDVPGDRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDTTEYEVSLICANDHGFDSNPAKET

FTTGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIASFQYLQKSSYDEHAKL

VQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECF

LQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYAEQYN

EILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQT

35 FPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAE LAKYMCENQATISSKLQTCCKP

ES 2 819 075 T3

LLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYS
VLLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYG
FQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCL
LHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVEDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQ
5 IKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMD DFAQLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRSKDA
LA

SEQ ID NO. 159

Clon M31; los bucles BC, DE, FG están subrayados

IEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTYGIKDVPGDRTTIDLPDFHFHNYSIGNLKPDE
10 YEVSLICANDHGFDSYPAKETFTT

SEQ ID NO. 160

Clon M31N49Q; mutación N49Q subrayada

IEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTYGIKDVPGDRTTIDLPDFHFHQYSIGNLKPDE
YEVSLICANDHGFDSYPAKETFTT

15 SEQ ID NO. 161

M31N49Q-1GS-M31N49Q constructo bivalente; mutación N49Q subrayada

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTYGIKDVPGDRTTIDLPDFHFHQYSIGNLKP
TEYEVSLICANDHGFDSYPAKETFTTTGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWHDPSGY
DFWCELTYGIKDVPGDRTTIDLPDFHFHQYSIGNLKPDEYEVSLICANDHGFDSYPAKET

20 FTT

SEQ ID NO. 162

M31N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S constructo monovalente; mutaciones subrayadas

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTYGIKDVPGDRTTIDLPDFHFHQYSIGNLKP
TEYEVSLICANDHGFDSYPAKETFTTTGGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHF

25 KGLVLI^AFSQYLQKSSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPN
LRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYL

HEVARRHPYFYAPELLYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMK
CSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAE

LAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCCKNY
30 AEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVLLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQP

LVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCT
LPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVEDETYVP

KEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMD DFAQLDTC
KAADKDTCFSTEGPNLVTRSKDALA

35 SEQ ID NO. 163

ES 2 819 075 T3

M31N49Q-1GS-M31N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S constructo bivalente; mutaciones subrayadas

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTYGIKDVPGDRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKP
TEYEVSLICANDHGFDSYPAKETFTTTGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWHDPSGY
DFWCELTYGIKDVPGDRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPTEYEVSLICANDHGFDSYPAKET
5 FTTGGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKSSYDEHAKL
VQEVTDFAKTCVADESAA^NCDKSLH^LTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECF
LQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYN
EILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKGERAFKAWAVARLSQT
FPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKP
10 LLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYS
VLLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYG
FQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCL
LHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVEDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQ
IKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRSKDA
15 LA

SEQ ID NO. 164

Clon D1 - Tn3 de control negativo

IEVKDVTDTTALITWSPGERIWMFTGCELTYGIKDVPGDRRTTIDLTEDENQYSIGNLKP
TEYEVSLICPNYERISNPAKETFTTT

20 SEQ ID NO. 165

D1-1GS-D1-3G-MSA-C34S/C579S constructo bivalente; mutaciones subrayadas

SQIEVKDVTDTTALITWSPGERIWMFTGCELTYGIKDVPGDRRTTIDLTEDENQYSIGNL
PDTEYEVSLICPNYERISNPAKETFTTTGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWSPGER
IWMFTGCELTYGIKDVPGDRRTTIDLTEDENQYSIGNLKPTEYEVSLICPNYERISNPAK
25 ETFTTGGGGSGGGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKSSYDEHA
KLVQEVTDFAKTCVADESAA^NCDKSLH^LTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNE
CFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQ
YNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKGERAFKAWAVARLS
QTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCK
30 KPLLKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPD
YSVLLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGE
YGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRV
CLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVEDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKE
KQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRSK
35 DALA

ES 2 819 075 T3

SEQ ID NO. 166

Mutante de RDG a SDG del clon 342; mutación subrayada

IEVKDVTDTTALITWSDDFGGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDE

YEVSLICRSGDMSSNPAKETFTT

5 SEQ ID NO. 167

309FGwt consenso

Todas las hebras son hebras de Tn3 originales; la hebra C beta es una variante de CELTYGI (SEQ ID NO: 14); los bucles AB, CD, EF son bucles de Tn3 originales

X1= Ser o Leu

10 X2= Asp o Glu

X3= His, Ile, Val, Phe o Trp

X4= Ala, Gly, Glu o Asp

X5= Glu, Leu, Gln, Ser, Asp o Asn

X6= Phe o Tyr

15 X7= Ile, Val, His, Glu o Asp

X8= Gly, Trp o Val

X9= Trp, Phe o Tyr

X10= Ser, Gln, Met o His

X11= Trp o His

20 X12= Arg o Ser

IEVKDVTDTTALITWX1DX2X3X4X5X6X7X8CELTYGIKDVPGDRTTIDLWX9HX10AX11YSIGNLKPDEYEVSLICRX
12GDMSSNPAKETFTT

SEQ ID NO. 168

309FGwt consenso, bucle BC

25 X1= Ser o Leu

X2= Asp o Glu

X3= His, Ile, Val, Phe o Trp

X4= Ala, Gly, Glu o Asp

X5= Glu, Leu, Gln, Ser, Asp o Asn

30 X6= Phe o Tyr

X7= Ile, Val, His, Glu o Asp

X8= Gly, Trp o Val

X1DX2X3X4X5X6X7X8

SEQ ID NO. 169

35 309FGwt consenso, bucle DE

X9= Trp, Phe o Tyr

- X10= Ser, Gln, Met o His
 X11= Trp o His
 WX9HX10AX11
 SEQ ID NO. 170
- 5 309FGwt consenso, bucle FG
 X12= Arg o Ser
 RX12GDMSSNPA
 SEQ ID NO. 171
- 10 311 consenso; todas las hebras son hebras de Tn3 originales; dos variantes de la hebra beta C (SEQ ID NO: 13 y 14);
 el bucle CD es un bucle de Tn3 original
 X1= Lys o Glu
 X2= Thr o Ile
 X3= Asn o Ala
 X4= Ser, Leu, Ala, Phe o Tyr
- 15 X5= Tyr, Ala, Gly, Val, Ile o Ser (contacto BC/N-term)
 X6= Tyr, Ser, Ala o His
 X7= Asn, Asp, His o Tyr
 X8= Leu, Phe, His o Tyr
 X9= His, Pro, Ser, Leu o Asp
- 20 X10= Gly, Phe, His o Tyr
 X11= Ala o Thr
 X12= Ser, Asn, Glu, Arg o Asp
 X13= Ser, Gln, Thr, Asn o Ala
 X14= Pro, Val, -, Ile o Ala (- ningún aminoácido)
- 25 X15= - o Ile (- ningún aminoácido)
 X16= Glu o Lys
 X17= Ser o Asn
- IEVX1DVTDTTALITWX2X3RSX4X5X6X7X8X9X10CELX11YGIKDVPGDRTTIDLX12X13X14X15YVHYSIGNLKPDT
 X16YEVSLICLTTDGTGX17NPAKETFTT
- 30 SEQ ID NO. 172
 311 consenso; hebra beta C en los clones de la familia 311
 X11= Ala o Thr
 CELX11YGI
 SEQ ID NO. 173
- 35 311 consenso; bucle AB
 X1= Lys o Glu

ES 2 819 075 T3

X1DVTDDT

SEQ ID NO. 174

311 consenso; bucle BC

X2= Thr o Ile

5 X3= Asn o Ala

X4= Ser, Leu, Ala, Phe o Tyr X5= Tyr, Ala, Gly, Val, Ile o Ser (contacto BC/N-term)

X6= Tyr, Ser, Ala o His

X7= Asn, Asp, His o Tyr

X8= Leu, Phe, His o Tyr

10 X9= His, Pro, Ser, Leu o Asp

X10= Gly, Phe, His o Tyr

X2X3RSX4X5X6X7X8X9X10

SEQ ID NO. 175

311 consenso; bucle DE

15 X12= Ser, Asn, Glu, Arg o Asp X13= Ser, Gln, Thr, Asn o Ala

X14= Pro, Val, -, Ile o Ala (- ningún aminoácido)

X15= - o Ile (- ningún aminoácido)

X12X13X14X15YVH

SEQ ID NO. 176

20 311 consenso; bucle EF

X16= Glu o Lys

GNLKPDTX16

SEQ ID NO. 177

311 consenso; bucle FG

25 X17= Ser o Asn

LTTDGTXYX17NPA

SEQ ID NO. 178

BC9 NHT oligo; bucle BC

Códigos de los nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

30 ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTSCGNHTGSTNHTNHTNHTGGCTGTGAACTGACCTAT

GGCATTAAA

SEQ ID NO. 179

BC11 NHT oligo; bucle BC

Códigos de los nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

35 ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTBSTNHTNHTNHTNHTNHTNHTGGCTGTGAACTG

ES 2 819 075 T3

ACCTATGGCATTAAA

SEQ ID NO. 180

BC12 NHT oligo; bucle BC

Códigos de los nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

5 ACCGCGCTGATTACCTGGNHTVMACCGNHTNHTNHTRRRCRGCNHTVTTNHTGGCTGTGAA
CTGACCTATGGCATTAAA

SEQ ID NO. 181

DE NHT oligo; bucle DE

Códigos de los nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

10 CGATCGCACCACCATAGATCTGNHTNHTNHTNHTNHTTATAGCATTGGTAACCTGAA
ACCG

SEQ ID NO. 182

FG9 NHT oligo; bucle FG

Códigos de los nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

15 GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTGGTNHTNHTNHTKCGAAAGAAACC
TTTACCACCGGTG

SEQ ID NO. 183

FG10 NHT oligo; bucle FG

Códigos de los nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

20 GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTNHTNHTRGCNHTCCGGCGAAAGAA
ACCTTTACCACCGGTG

SEQ ID NO. 184

FG11 NHT oligo; bucle FG

Códigos de los nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

25 GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNHTNHTGGTNHTNHTAGCAACCCGGCGAAA
GAAACCTTTACCACCGGTG

SEQ ID NO. 185

BCX-DE bridge v2 oligo

CAGATCTATGGTGGTGGCAGATCGCCCGGCACATCTTTAATGCCATAGGTCAGTTCACA

30 SEQ ID NO. 186

DE-FGX bridge v2 oligo

GCAAATCAGGCTCACTTCATATTCGGTATCCGGTTTCAGGTTACCAATGCTAT

SEQ ID NO. 187

KpnI amp rev v2 oligo

35 CGGGTCGGTTGGGGTACCGCCACCGGTGGTAAAGGTTTCTTT

ES 2 819 075 T3

SEQ ID NO. 188

KpnI reverse v2 oligo

CGGGTCGGTTGGGGTA

SEQ ID NO. 189

5 BC colección amp v2 oligo

GGCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATAACCACCGCGCTGAT

TACCTGG

SEQ ID NO. 190

BC9 PCR oligo

10 Códigos de los nucleótidos: 1= Codones para todo 19aa(-cys) 2= Codones para Ala/Pro 50/50; 3=
Codones para Ala/Gly

ACCGCGCTGATTACCTGGTCT1213111GGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATG

SEQ ID NO. 191

BC 9-loop NNK oligo

15 Códigos de los nucleótidos: K= 50% de G/50% de T

ACCGCGCTGATTACCTGGNNKNNKSMGNNKGSTNNKNNKNNKGGCTGTGAACTGACCTA

TGGCATTAAA

SEQ ID NO. 192

309 BC-loop NNKdope oligo

20 Códigos de los nucleótidos: 4= 70% de G, 10% de A, 10% de C, 10% de T; 5= 10% de G,70% de A,10% de C,10% de
T; 6=10% de G,10% de A,70% de C, 10% de T; 7= 10% de G,10% de A,10% de C,70% de T; 8= 70% de A, 15% de
C, 15% de T; y K= 50% de G/50% de T

ACCGCGCTGATTACCTGG76K45K45K77K44K65K78T45K44KTGTGAACTGACCTA

TGGCATTAAA

25 SEQ ID NO. 193

DE PCR oligo

Códigos de los nucleótidos: 1= Codones para todo 19aa(-cys)

GATGTGCCGGGCGATCGCACCCACCATAGATCTG111111TATAGCATTGGTAACCTGAAA

CCGG

30 SEQ ID NO. 194

Upstr BCloop Rev oligo

CCAGGTAATCAGCGCGGTGGTAT

SEQ ID NO. 195

BC shuffle rev oligo

35 CAGATCTATGGTGGTGGCGATCGC

SEQ ID NO. 196

DE shuffle FWD oligo

TGTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGT

SEQ ID NO. 197

BC11-311Gly oligo

5 Códigos de los nucleótidos: 1=70% de G, 10% de A, 10% de C, 10% de T; 2=10% de G, 70% de A, 10% de C, 10% de T; 3=10% de G, 10% de A, 70% de C, 10% de T; 4=10% de G, 10% de A, 10% de C, 70% de T; 5=70% de A, 15% de C, 15% de T; 6=15% de A, 70% de C, 15% de T; 7=15% de A, 15% de C, 70% de T; V=33% de A, 33% de C, 33% de G.

ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25T37T35TGGCTGTGAACTG

ACCTATGGCATTAAA

10 SEQ ID NO. 198

BC11-311NHT oligo

15 Códigos de los nucleótidos: 1=70% de G, 10% de A, 10% de C, 10% de T; 2=10% de G, 70% de A, 10% de C, 10% de T; 3=10% de G, 10% de A, 70% de C, 10% de T; 4=10% de G, 10% de A, 10% de C, 70% de T; 5=70% de A, 15% de C, 15% de T; 6=15% de A, 70% de C, 15% de T; 7=15% de A, 15% de C, 70% de T; V=33% de A, 33% de C, 33% de G; y H=33% de A, 33% de C, 33% de T

ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25T37T35TNHTTGTGAACTG

ACCTATGGCATTAAA

SEQ ID NO. 199

BC colección amp K4E oligo

20 GGCCAGCCGCGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAGATGTGACCGATACCACCGCGCTGAT

TACCTGG

SEQ ID NO. 200

Variante de HSA con semivida prolongada (C34S, L463N, K524L); las mutaciones están subrayadas

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI¹FAQYLQ²QSPFEDHV³KL⁴VNEVTEFAKTCVADES⁵AE

25 NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLQHKDDNP⁶NLPRLV⁷RPEV

DVMCTAFHDNEETFLK⁸KYLYE⁹IARRHPYFYAP¹⁰ELLFFAKRYKAA¹¹FTECCQAADKAA¹²CLLP

KLDEL¹³RDEGKASSAKQRLK¹⁴CASLQK¹⁵GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLV¹⁶DTLTK

VHTECCHGDLLECADD¹⁷RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA

DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY¹⁸EYARRHPDYSV¹⁹VLLLRLAKTYETTLEKC

30 CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC²⁰ELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVST

PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSV²¹VLNQLCVN²²HEKTPVSDRVTKCCTES

LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI²³LKQTALVELVKHKPKAT

KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAE²⁴E²⁵GKLVAA²⁶SQAALGL

SEQ ID NO. 201

35 311K4E_12-I constructo monovalente variante (comprende el conector GS y C34S HSA); el conector y la serina mutada están subrayados

SQIEVEDVTD²⁷TALITW²⁸TNRSSYSNLHGCE²⁹LAYGIKDVPGDR³⁰TTIDL³¹NQPYVHYSIGNLK

PDTEYEVSLICLTTDGTYN³²PAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL

VLI³³FAQYLQ³⁴QSPFEDHV³⁵KL³⁶VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE

TYGEMADCCAKQEPERNECFHQKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI
 ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKAS
 LQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
 YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
 5 KDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
 EPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
 AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
 NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD
 DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

10 SEQ ID NO. 202

311K4E_12-I constructo monovalente variante (comprende la variante CELTYG de la hebra C beta, el conector todo G y C34S HSA); el conector y la serina mutada están subrayados

SQIEVEDVTDTTALITWTRSSYSNLHGCELTGKIDVPGDRRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSLICLTTDGTYNPAKETFTTGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
 15 VLIIFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE
 TYGEMADCCAKQEPERNECFHQKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI
 ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKAS
 LQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
 YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
 20 KDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
 EPQNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
 AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
 NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD
 DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

25 SEQ ID NO. 203

311K4E_12-I constructo bivalente variante (comprende conectores GS y C34S HSA); los conectores y la serina mutada están subrayados

SQIEVEDVTDTTALITWTRSSYSNLHGCELAYGKIDVPGDRRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSLICLTTDGTYNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVEDVTDTT
 30 ALITWTRSSYSNLHGCELAYGKIDVPGDRRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVSLICL
 TTDGTYNPAKETFTTGGGGSGGGGSDDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQS
 PFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
 EPERNECFHQKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL
 LFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAW
 35 AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK
 LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EY

ARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC
FEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK

5 LVAASQAALGL
SEQ ID NO. 204

311K4E_12-I constructo bivalente variante (comprende conectores todo G y S34 HSA); los conectores y la serina mutada están subrayados

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTGKIDVPGDRRTTIDLNQPYVHYSIGNLK

10 PDTEYEVSLICLTTDGTYNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVEDVTDTT
ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGKIDVPGDRRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVSLICL
TTDGTYNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI^uAFAQYLQ^uQ^u

PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
EPERNECFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL

15 LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKDELREDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFKAW
AVARLSQRFKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK
LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY^uEY
ARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC
FEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS
20 VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK
LVAASQAALGL

SEQ ID NO. 205

309-3GS-309 constructo bivalente

25 SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCCELTGKIDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPD
TEYEVSLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDEFGHYDGCCELTGKIDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDTEYEVSLICYTDQEA
GNPAKETFTT

SEQ ID NO. 206

30 309-2GS-HSAC34S constructo monovalente

SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCCELTGKIDVPGDRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPD
TEYEVSLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQ^uQ^uSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR
35 HPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKDELREDEGKASSAQRLKASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC

ENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
FLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ
NLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKR
MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
5 TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO. 207

309-3GS-309-2GS-HSAC34S constructo bivalente

SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKP
10 TEYEVSLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDEFGHYDGCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDTTEYEVSLICYTDQEA
GNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR
15 YKAAFECCQAADKAACLPLKDELDEGKASSAQRLKQKASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCE
KPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD
YSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
20 CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEGKKLVAASQ
AALGL

SEQ ID NO. 208

342-3GS-342 constructo bivalente

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKP
25 TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDDFGGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTTEYEVSLICRSGDMS
SNPAKETFTT

SEQ ID NO. 209

30 Módulo conector Gly-Ser, $(G_4X)_n$ donde X=G, S, A, L, I o V y n = 1-7; se muestra el módulo $(G_4X)_n$ donde n=1
GGGGX

SEQ ID NO. 210

Mutante L25/M del péptido señal OppA

MTNITKRSLVAAGVLAALMAGNVAMA

35 Se hace constar que, con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz de soporte de Tenascina 3 (Tn3) que comprende dos subunidades monoméricas específicas para CD40L, conectadas en tándem,
- 5 donde la subunidad monomérica comprende siete hebras beta denominadas A, B, C, D, E, F y G, y seis regiones de bucles denominadas AB, BC, CD, DE, EF y FG, y donde la matriz de soporte de Tn3 se une específicamente a CD40L,
- donde la subunidad monomérica específica para CD40L comprende la secuencia de aminoácidos
- IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT
- 10 donde:
- (a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} y X_{FG} representan los residuos aminoácidos presentes en las secuencias de los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG, respectivamente;
- (b) X₁ representa un residuo aminoácido de A o T; y
- (c) la longitud del bucle *n* es un número entero comprendido entre 2 y 26, donde la secuencia del bucle BC comprende la SEQ ID NO: 86, la secuencia del bucle DE comprende la SEQ ID NO: 96, y la secuencia del bucle FG comprende la SEQ ID NO: 9 o 139.
- 15 2. La matriz de soporte de Tn3 de la reivindicación 1, donde la secuencia del bucle AB comprende la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 136, la secuencia del bucle CD comprende la SEQ ID NO: 6 y la secuencia del bucle EF comprende la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 137.
- 20 3. La matriz de soporte de Tn3 de la reivindicación 1 o 2, donde la subunidad monomérica específica para CD40L comprende una secuencia de SEQ ID NO: 28 o 146.
4. La matriz de soporte de Tn3 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las dos subunidades monoméricas específicas para CD40L están conectadas directamente.
- 25 5. La matriz de soporte de Tn3 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las dos subunidades monoméricas específicas para CD40L están conectadas mediante un conector.
- 30 6. La matriz de soporte de Tn3 de la reivindicación 5, donde el conector comprende un conector peptídico.
7. La matriz de soporte de Tn3 de la reivindicación 5 o 6, donde el conector peptídico comprende una secuencia (GmX)_n donde:
- (a) X es serina (S), alanina (A), glicina (G), Leu (L), isoleucina (I), o valina (V);
- 35 (b) m y n son números enteros;
- (c) m es 1, 2, 3 o 4; y
- (d) n es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.
- 40 8. La matriz de soporte de Tn3 de la reivindicación 7, donde el conector peptídico comprende SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 142, o SEQ ID NO: 143.
9. La matriz de soporte de Tn3 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde al menos una subunidad monomérica específica para CD40L está unida a un conector, o a un resto heterólogo.
10. La matriz de soporte de Tn3 de la reivindicación 9, donde al menos una subunidad monomérica específica para CD40L está conjugada con PEG o una albúmina.
- 45 11. La matriz de soporte de Tn3 de la reivindicación 10, donde la albúmina es seroalbúmina humana (HSA).
12. La matriz de soporte de Tn3 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la matriz de soporte de Tn3 comprende o consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 145.
- 50 13. Una matriz de soporte de Tn3 de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en un método para alterar la respuesta de señalización mediada por CD40, que comprende poner en contacto una célula que expresa CD40L con la matriz de soporte de Tn3, donde la matriz de soporte de Tn3 se une a CD40L e interrumpe la señalización mediada por CD40.

14. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una matriz de soporte de Tn3 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

5 15. Un método para producir una matriz de soporte de Tn3, que comprende cultivar una célula huésped, comprendiendo dicha célula huésped un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 14, en condiciones en las que se expresa la matriz de soporte de Tn3 codificada por la molécula de ácido nucleico.

16. Una composición que comprende una matriz de soporte de Tn3 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

17. La composición de la reivindicación 16, para uso en:

- 10 1) un método para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad autoinmune en un paciente que lo necesite; o
- 2) un método para reducir la frecuencia o cantidad de corticosteroides administrados a un paciente con una enfermedad autoinmune, opcionalmente

15 en donde la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, síndrome de Sjogren, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrofrental, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluyendo la enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otros tejidos, e inflamación crónica, sepsis, artritis reumatoide, peritonitis, enfermedad de Crohn, lesión por reperfusión, septicemia, choque endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (por ejemplo, artritis psoriásica), choque anafiláctico, isquemia de órganos, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo de aloinjerto. trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampoloso, cardiomiopatía, esprue-dermatitis celíaca, síndrome de disfunción inmunológica por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, 20 crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopenia idiopática (PTI), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conjuntivo mixta, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, panarteritis nudosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, 30 síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme, vasculitis, vitiligo, y granulomatosis de Wegener.

35

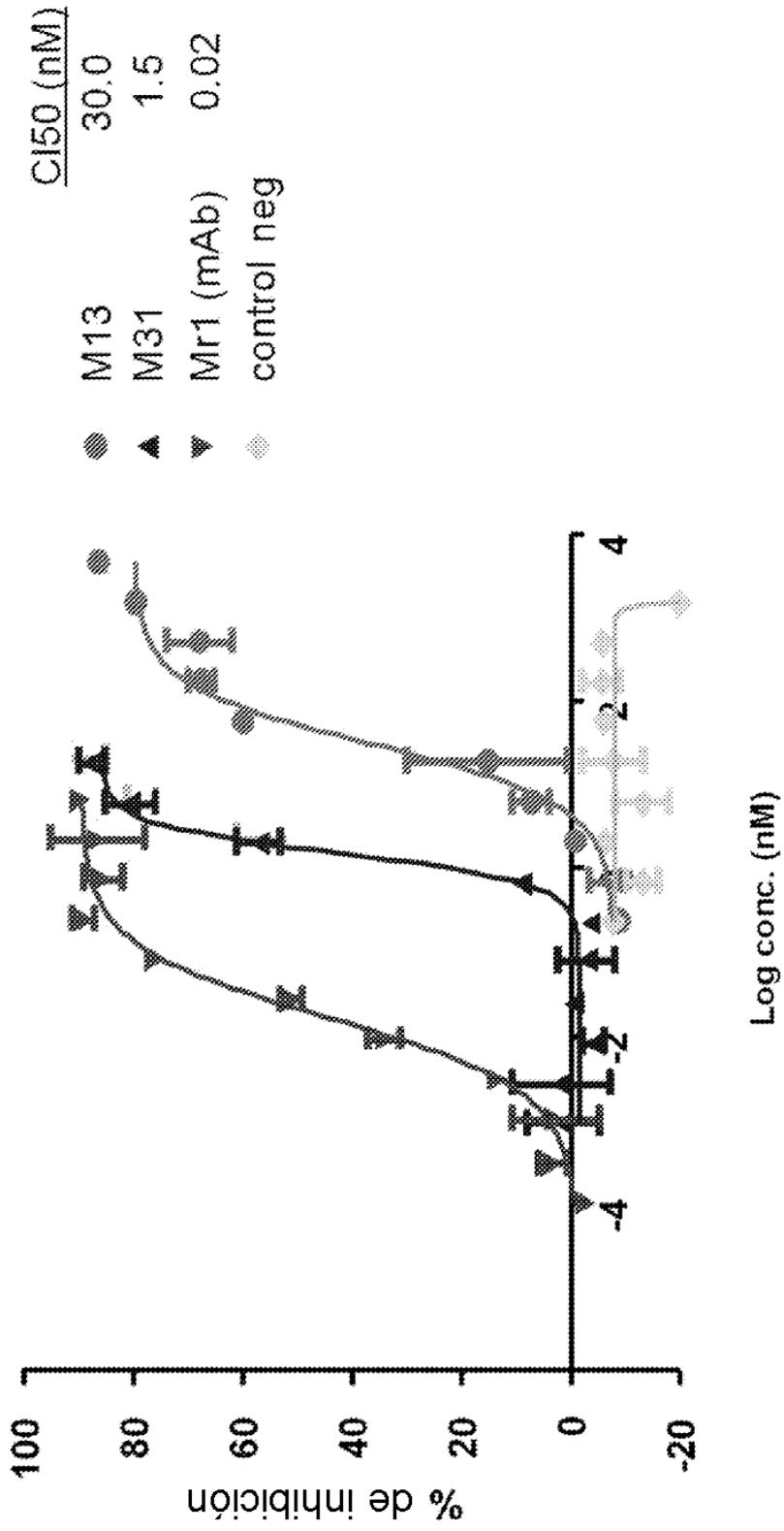


Fig. 1A

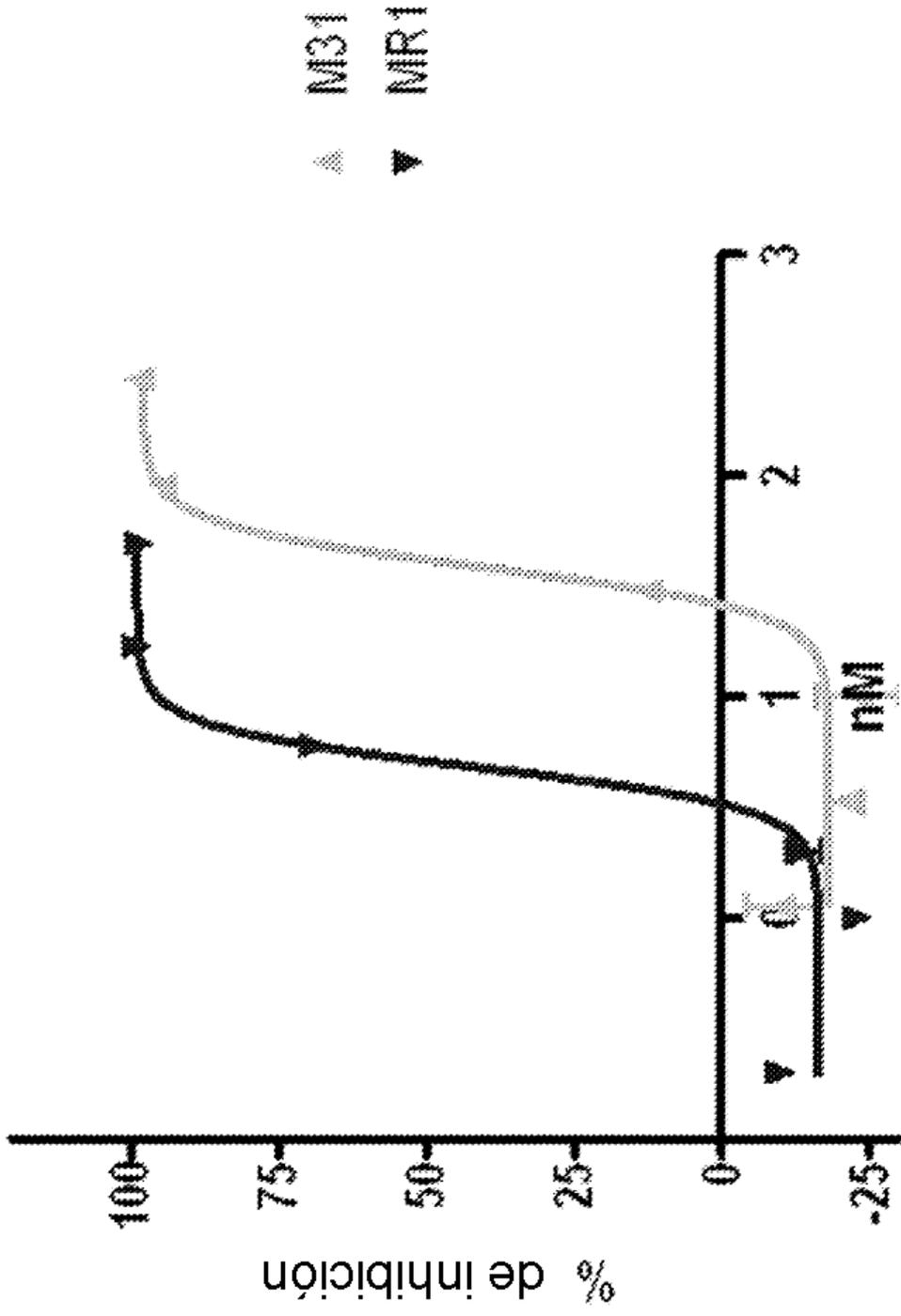
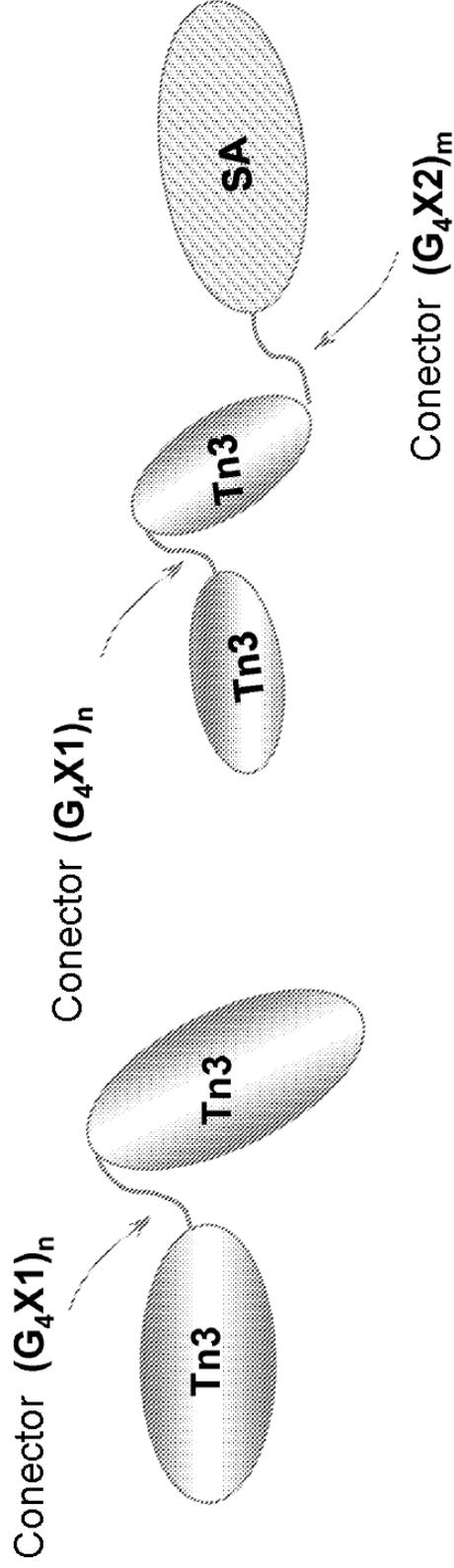


Fig. 1B

Matrices de soporte de CD40L bivalentes

Construccto de fusión de CD40L bivalente-albúmina sérica (SA)



X1=S o G o A

X2=S o G o A

n=1-7 (el conector puede incluir residuos adicionales)

m=1-7 (el conector puede incluir residuos adicionales)

Fig. 2A

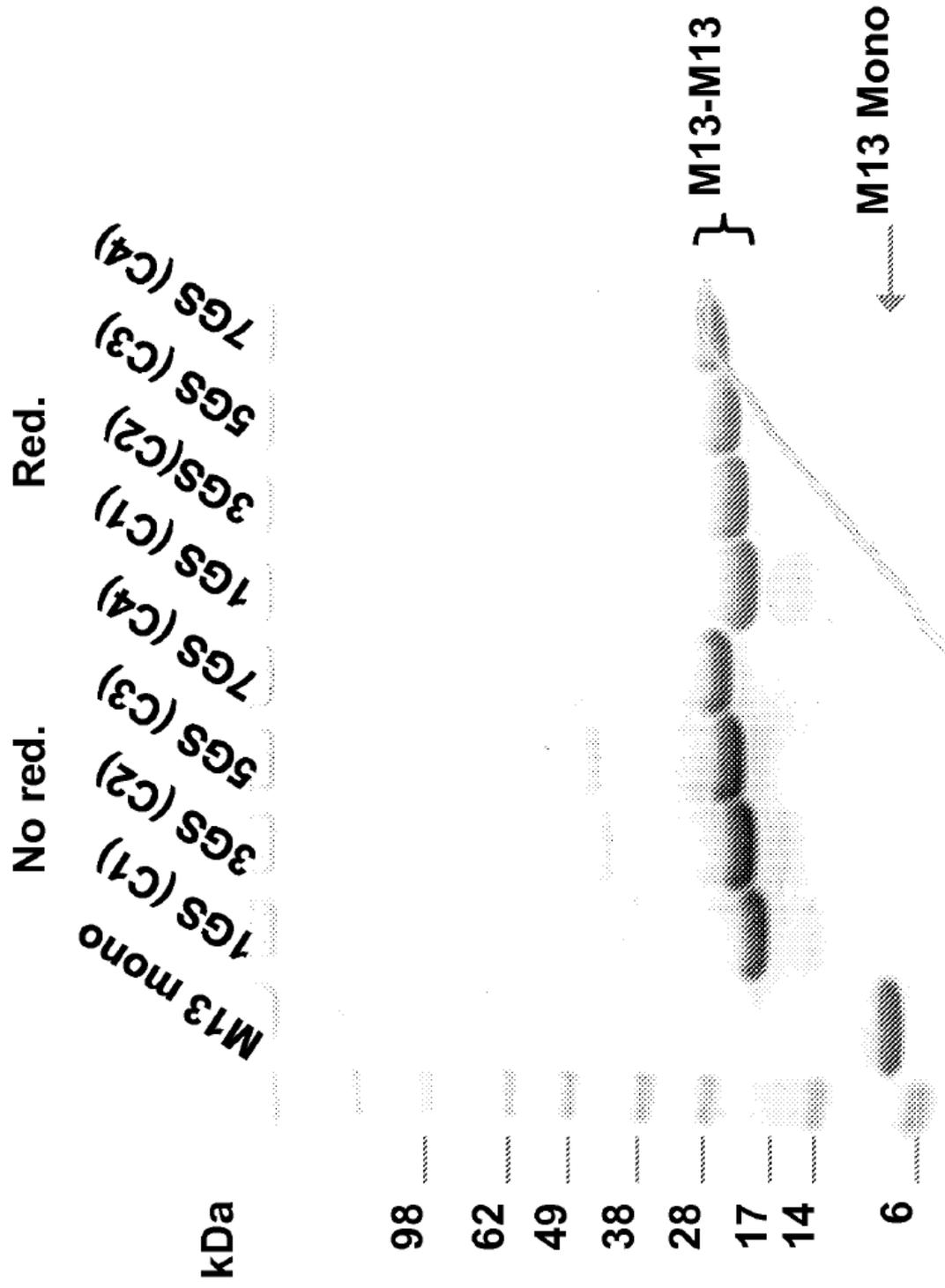


Fig. 2B

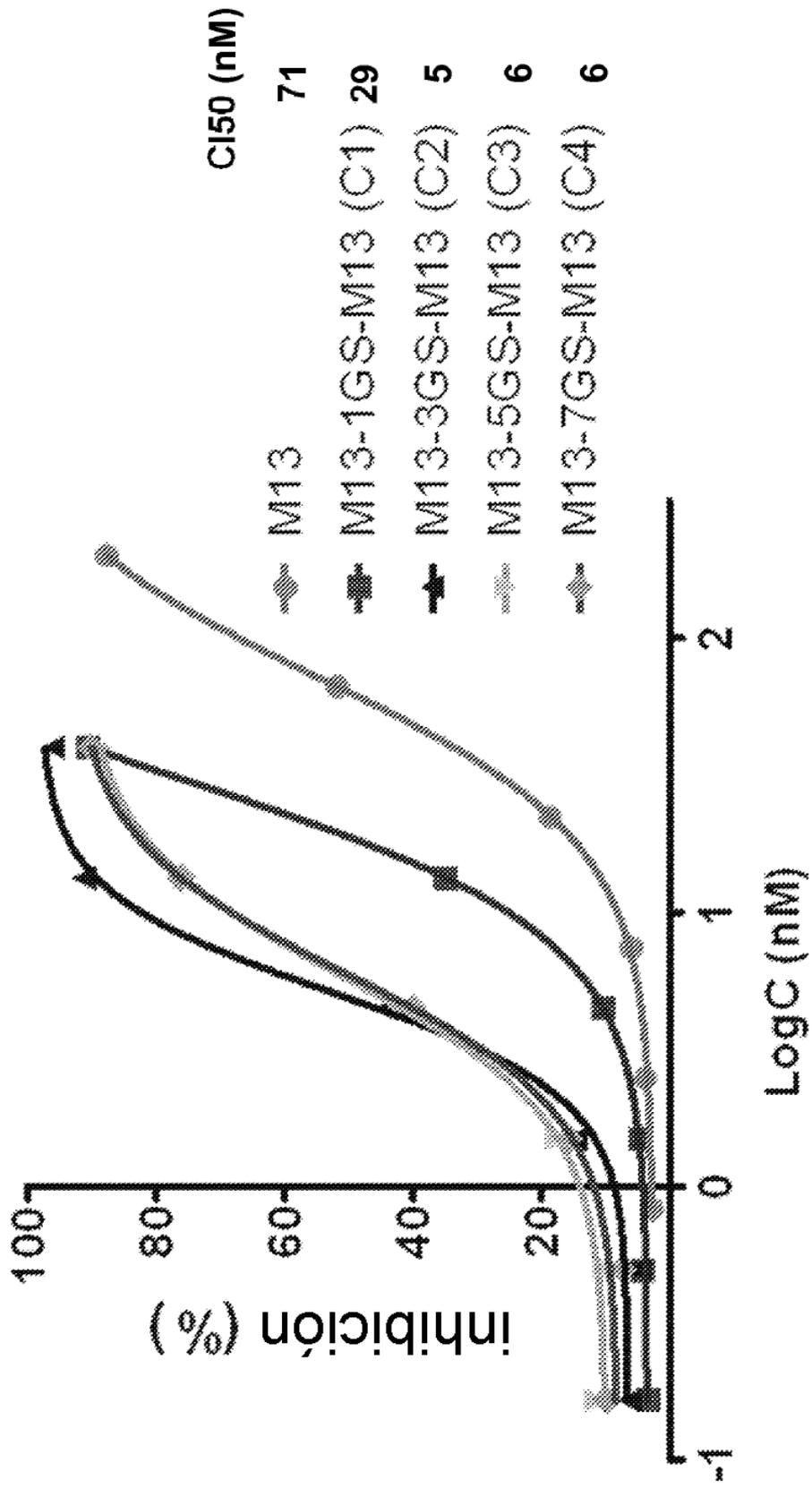


Fig. 2C

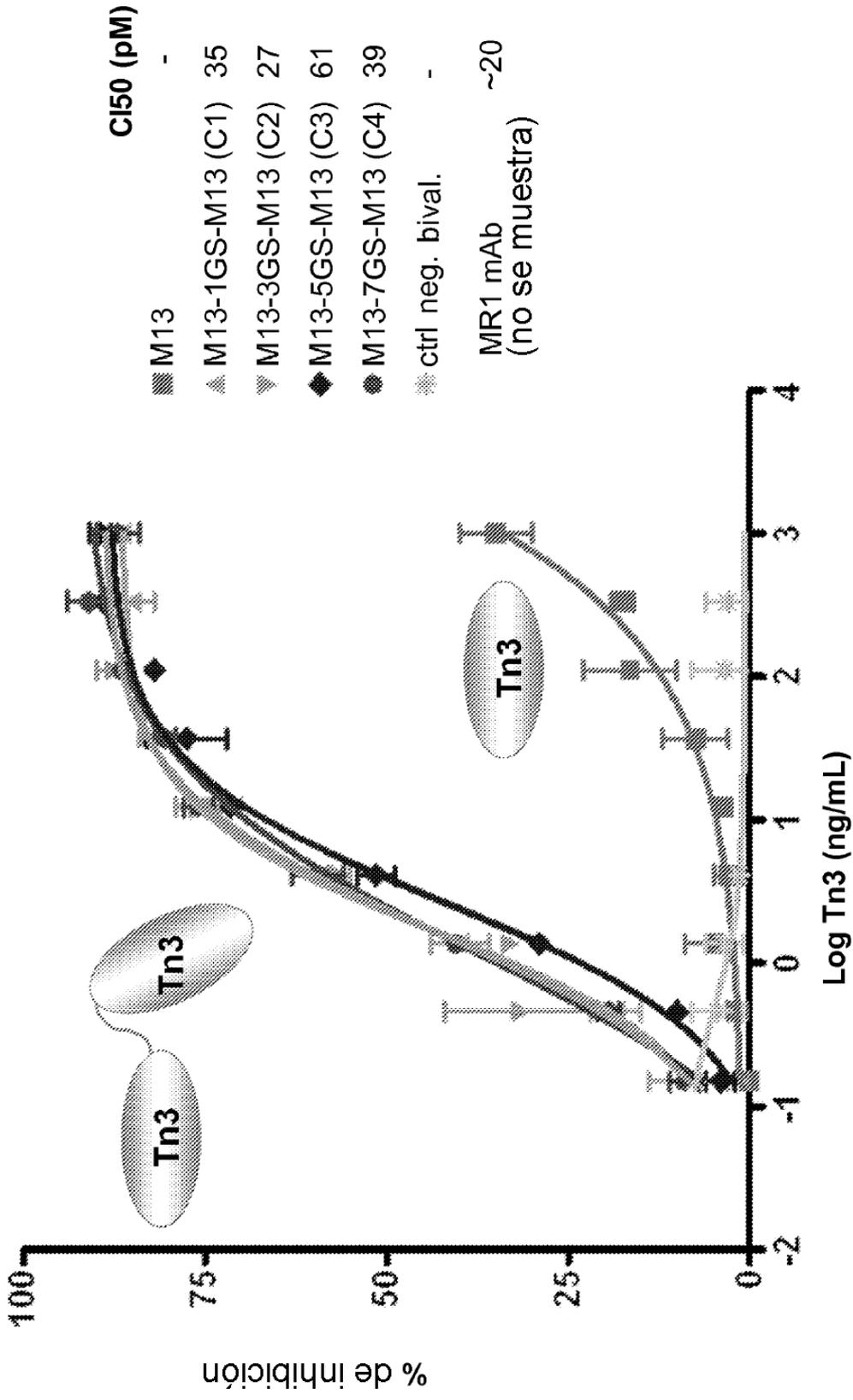


Fig. 2D

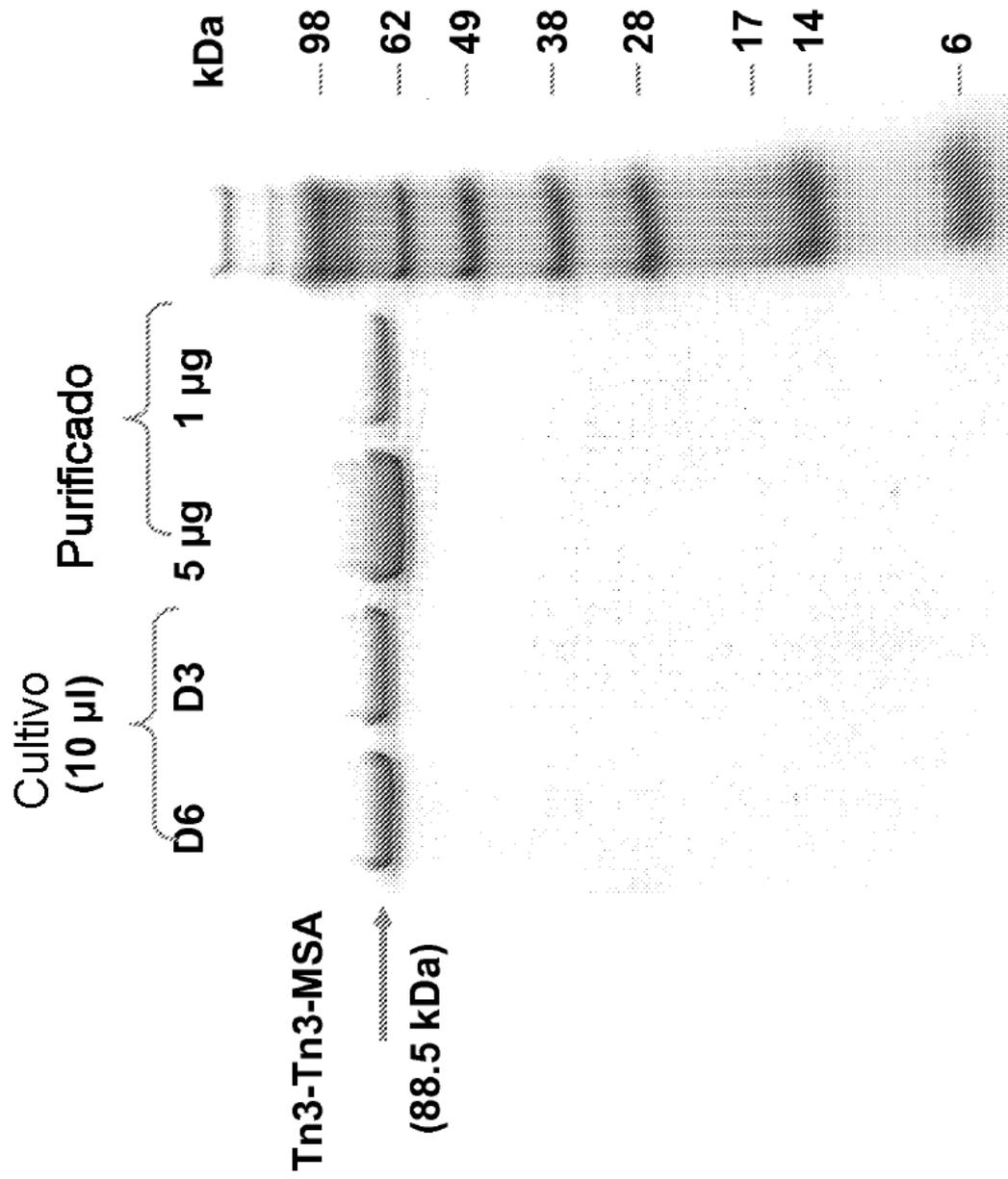


Fig. 3A

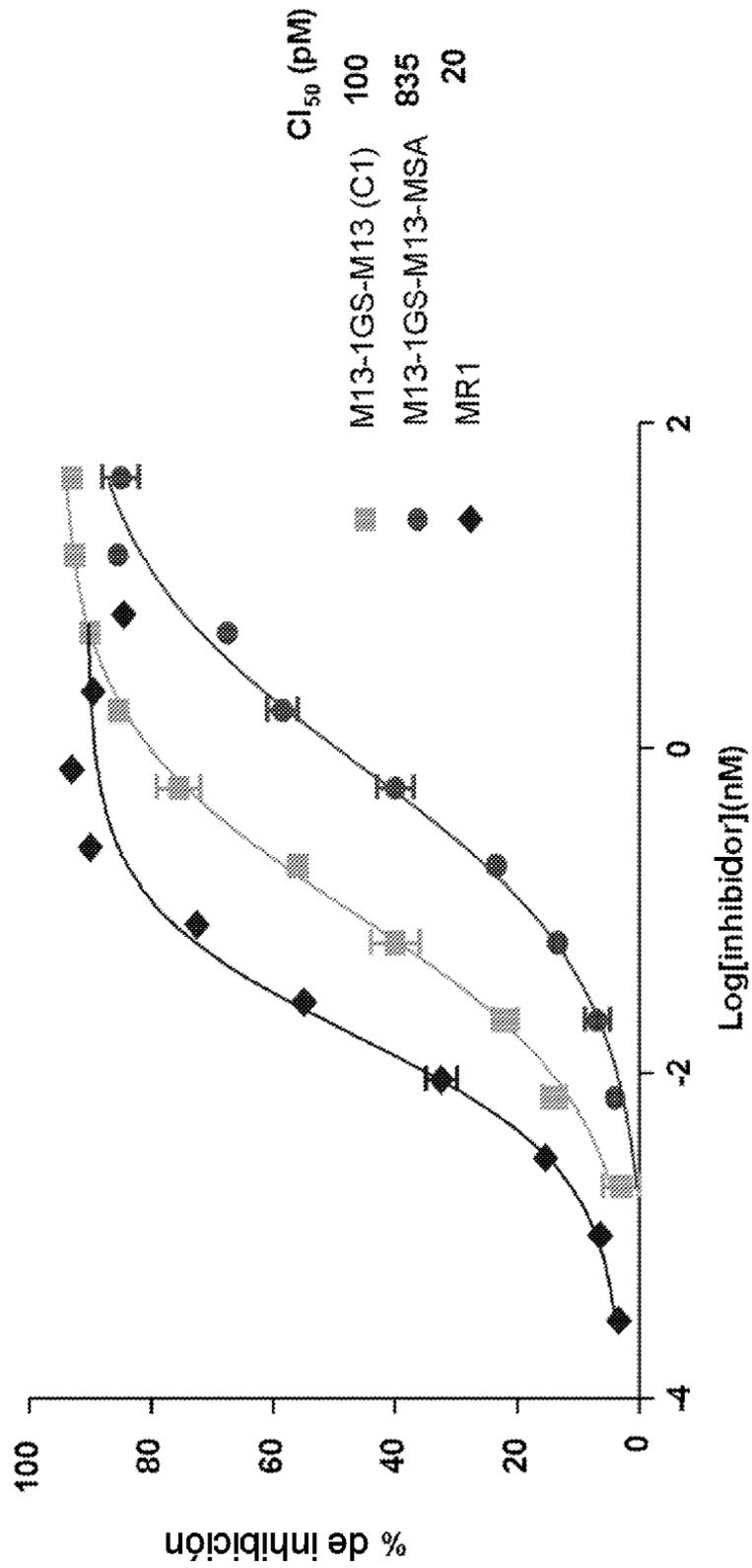


Fig. 3B

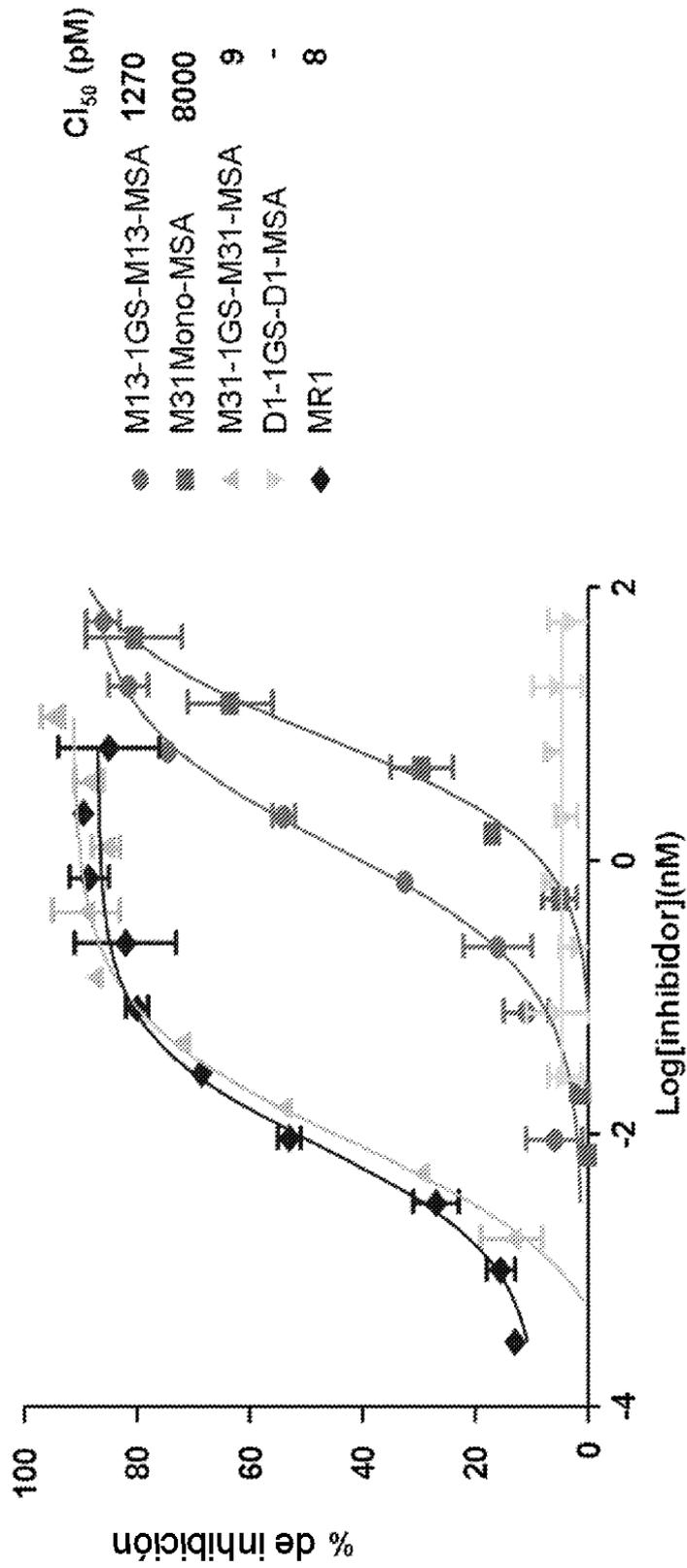


Fig. 3C

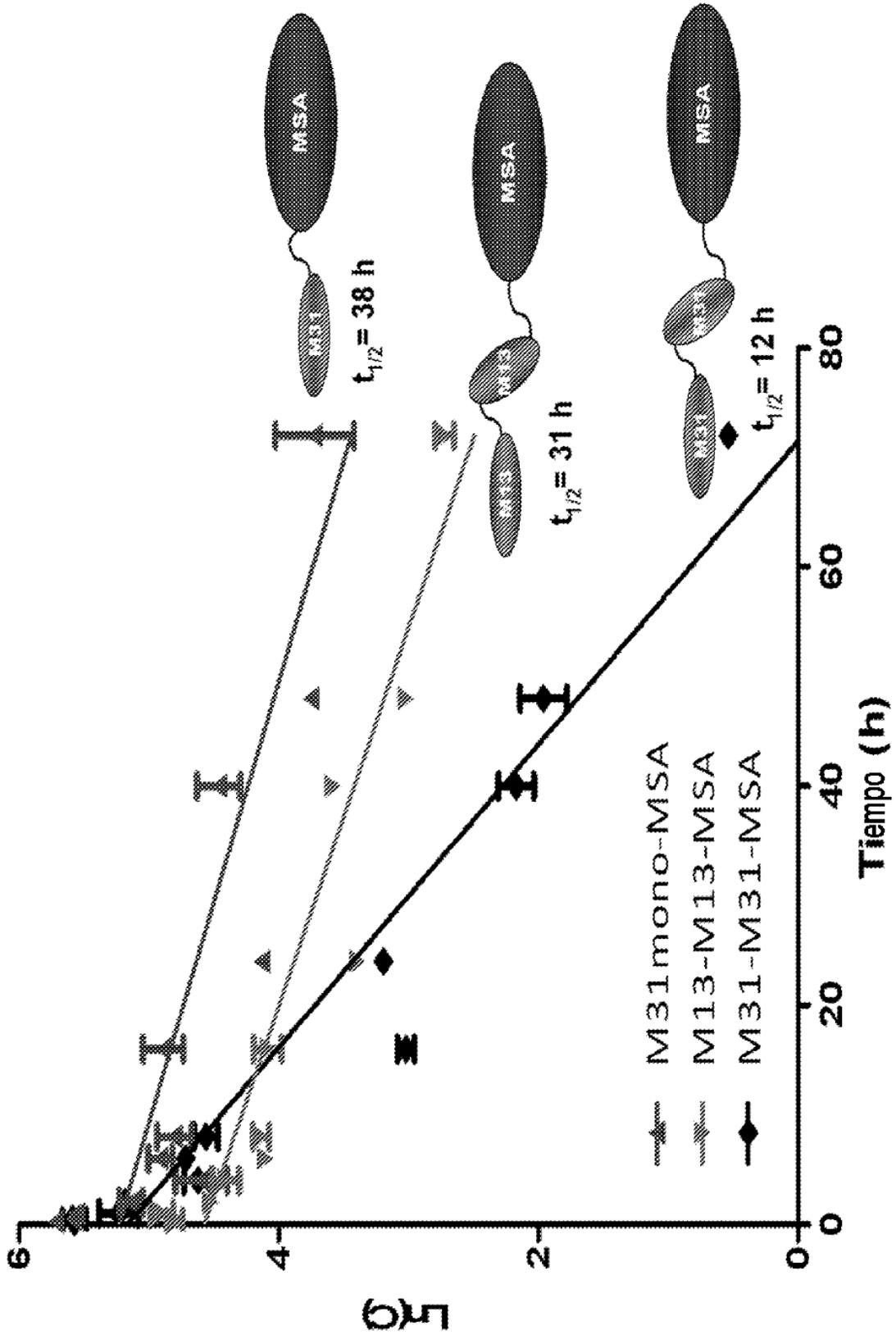


Fig. 4A

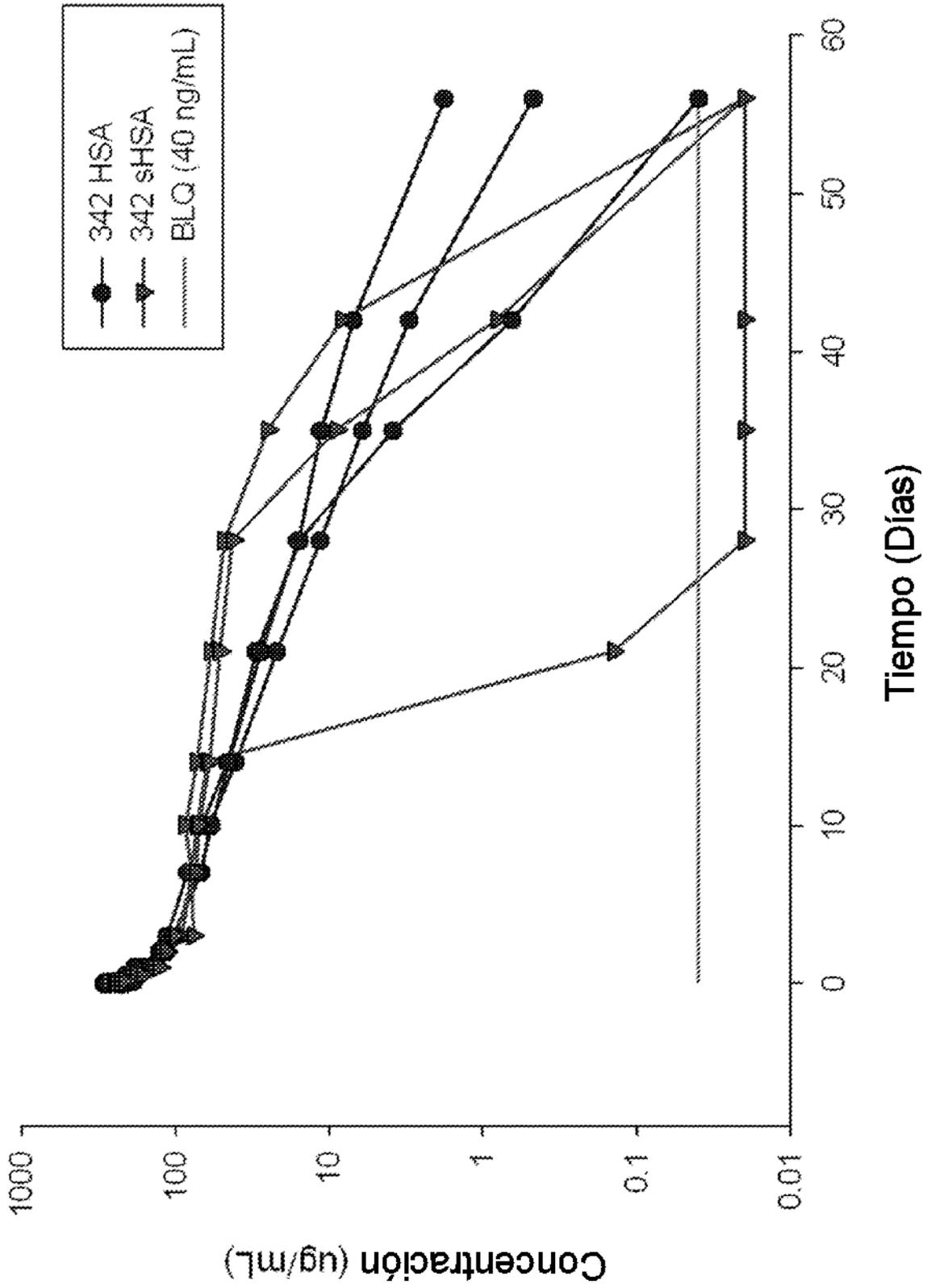


Fig. 4B

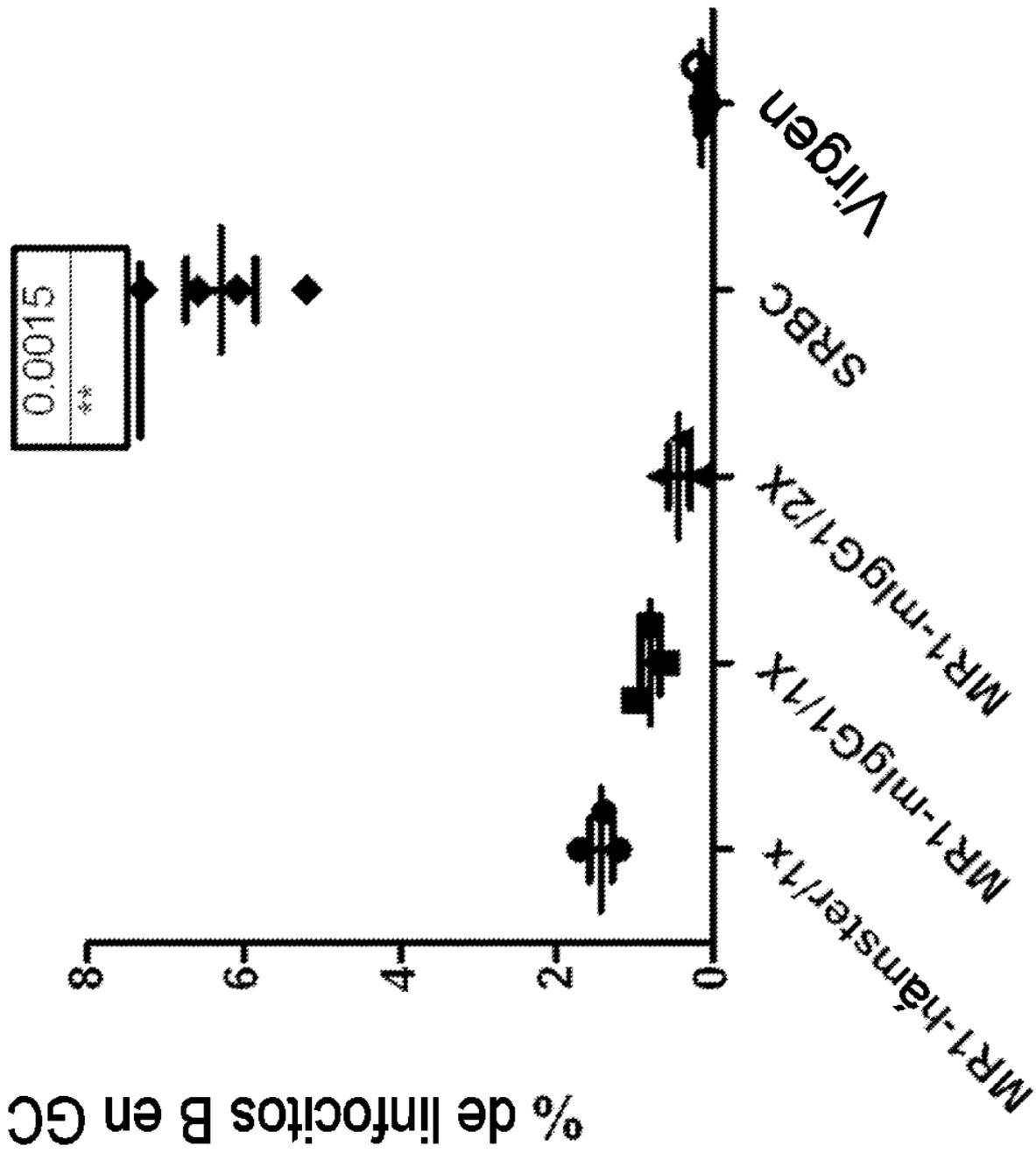


Fig. 5A

% de linfocitos B en GC

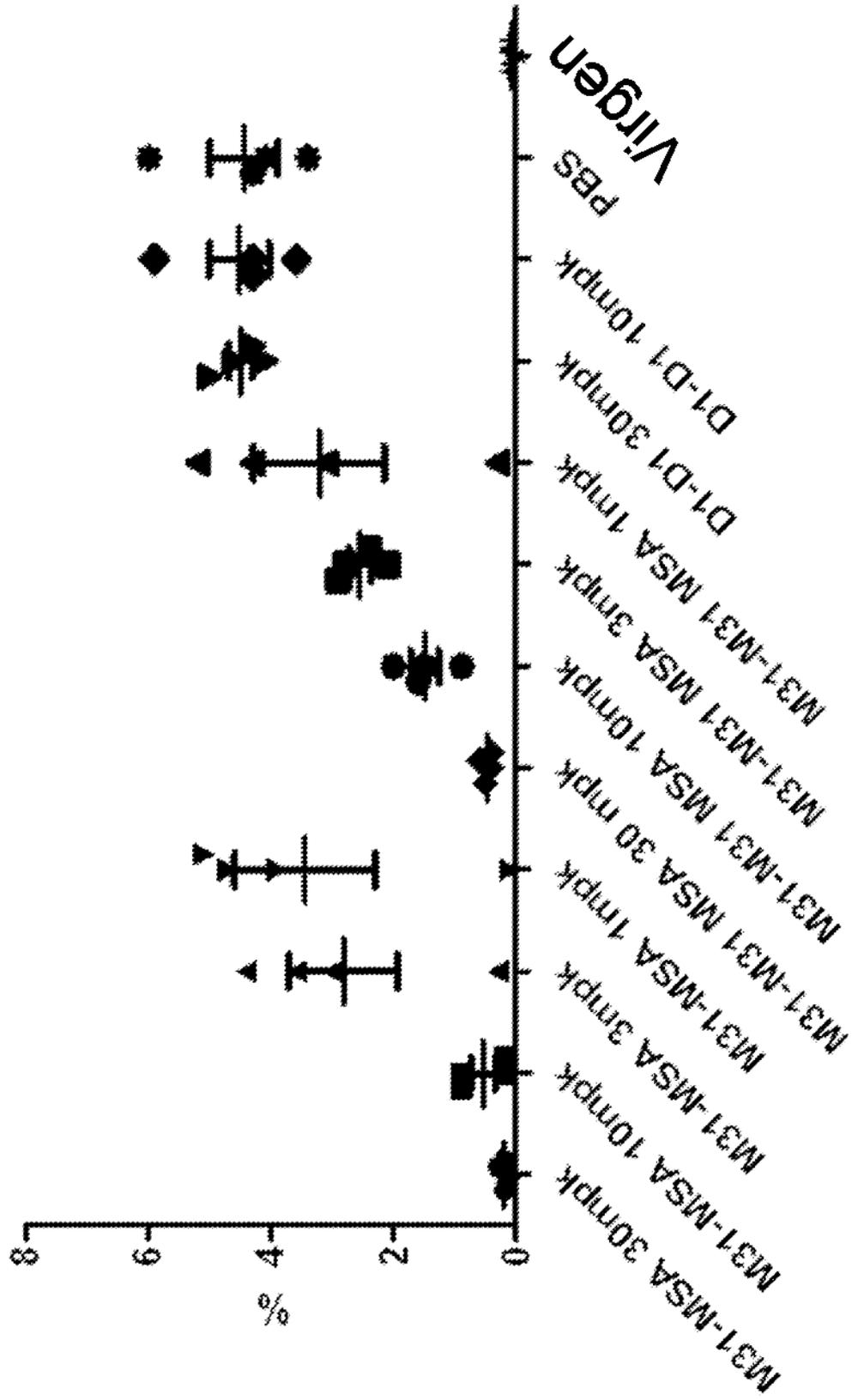


Fig. 5B

% de linfocitos B no GC

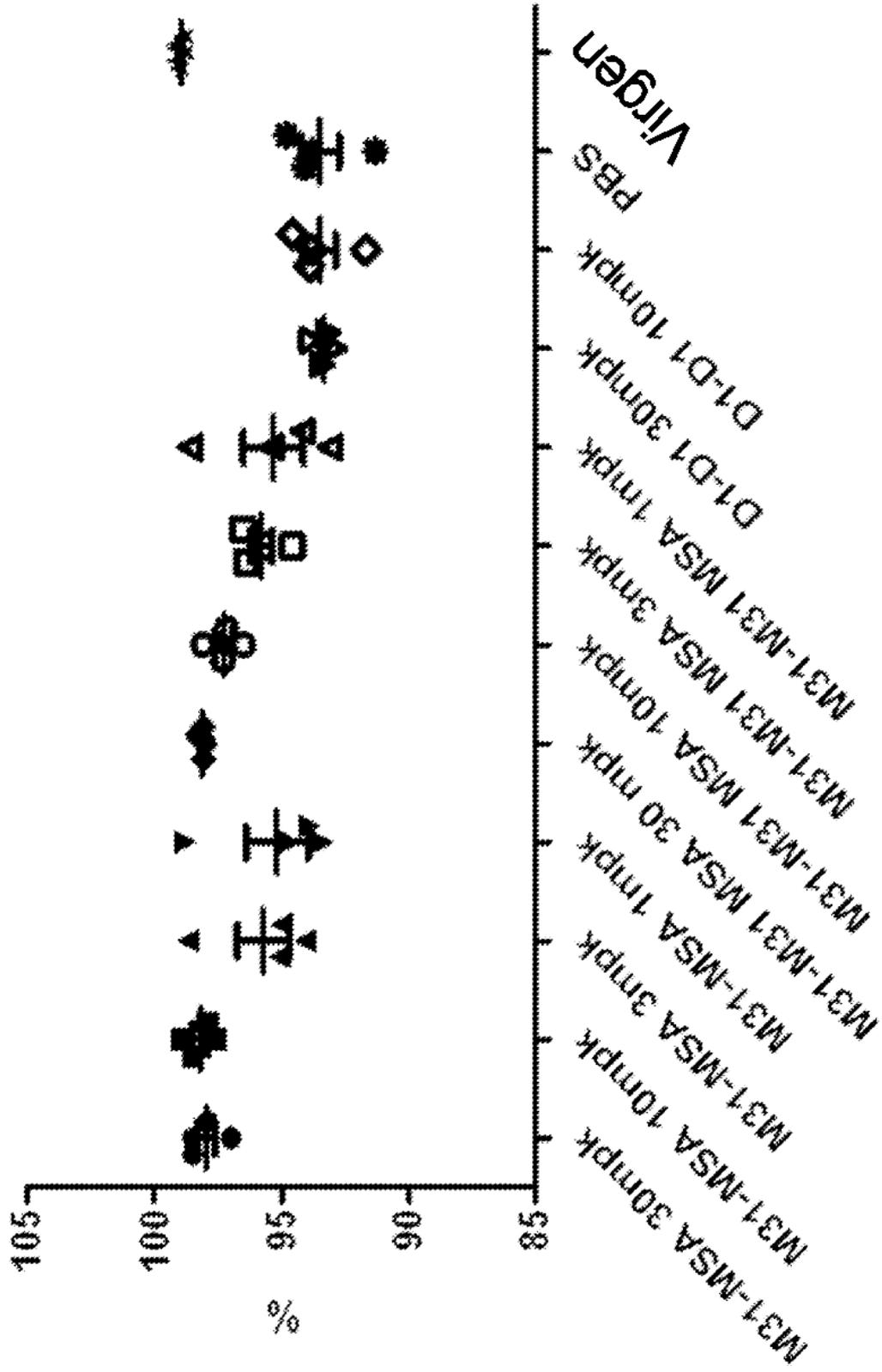


Fig. 5C

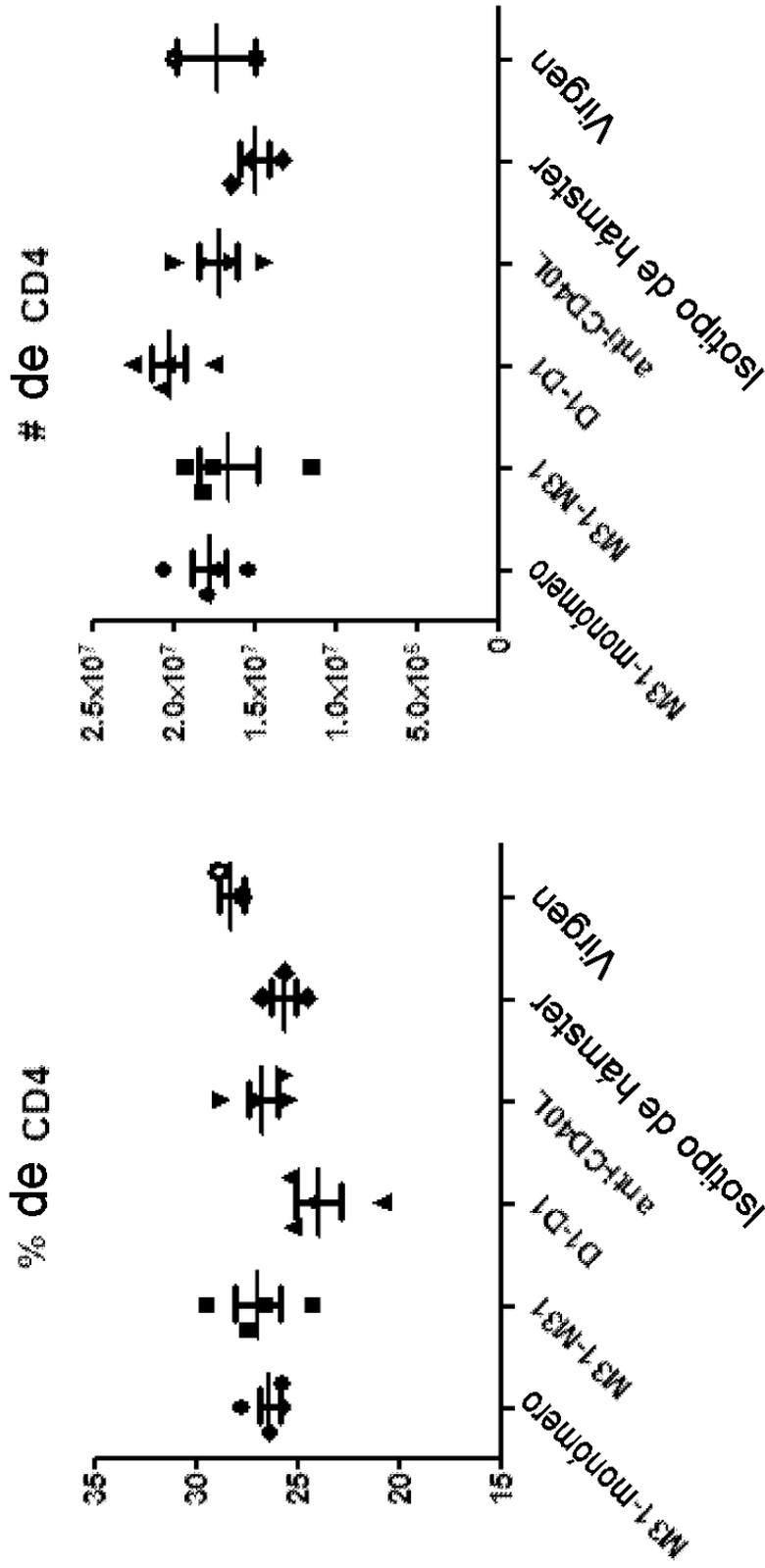


Fig. 5D

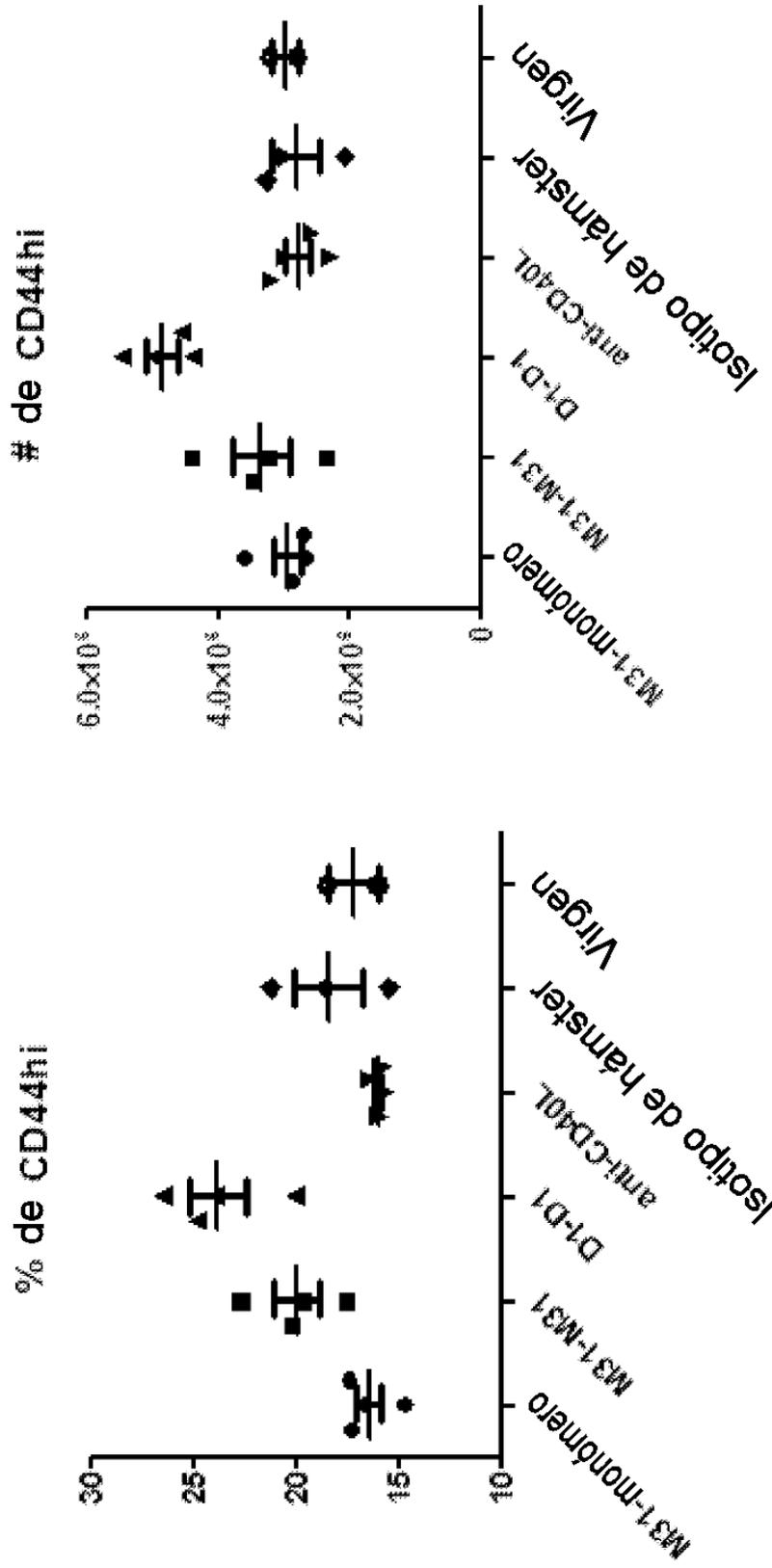


Fig. 5E

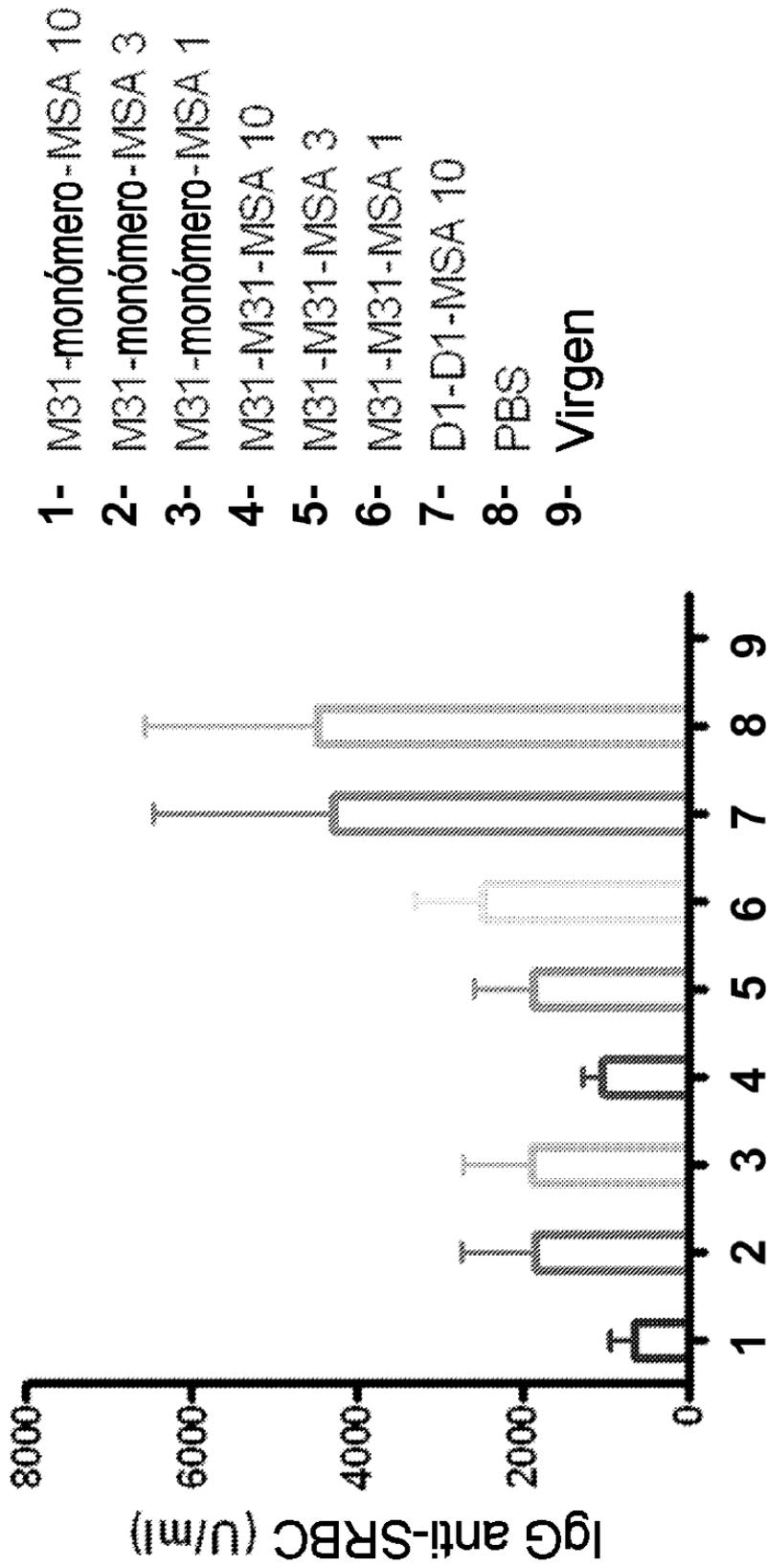


Fig. 5F

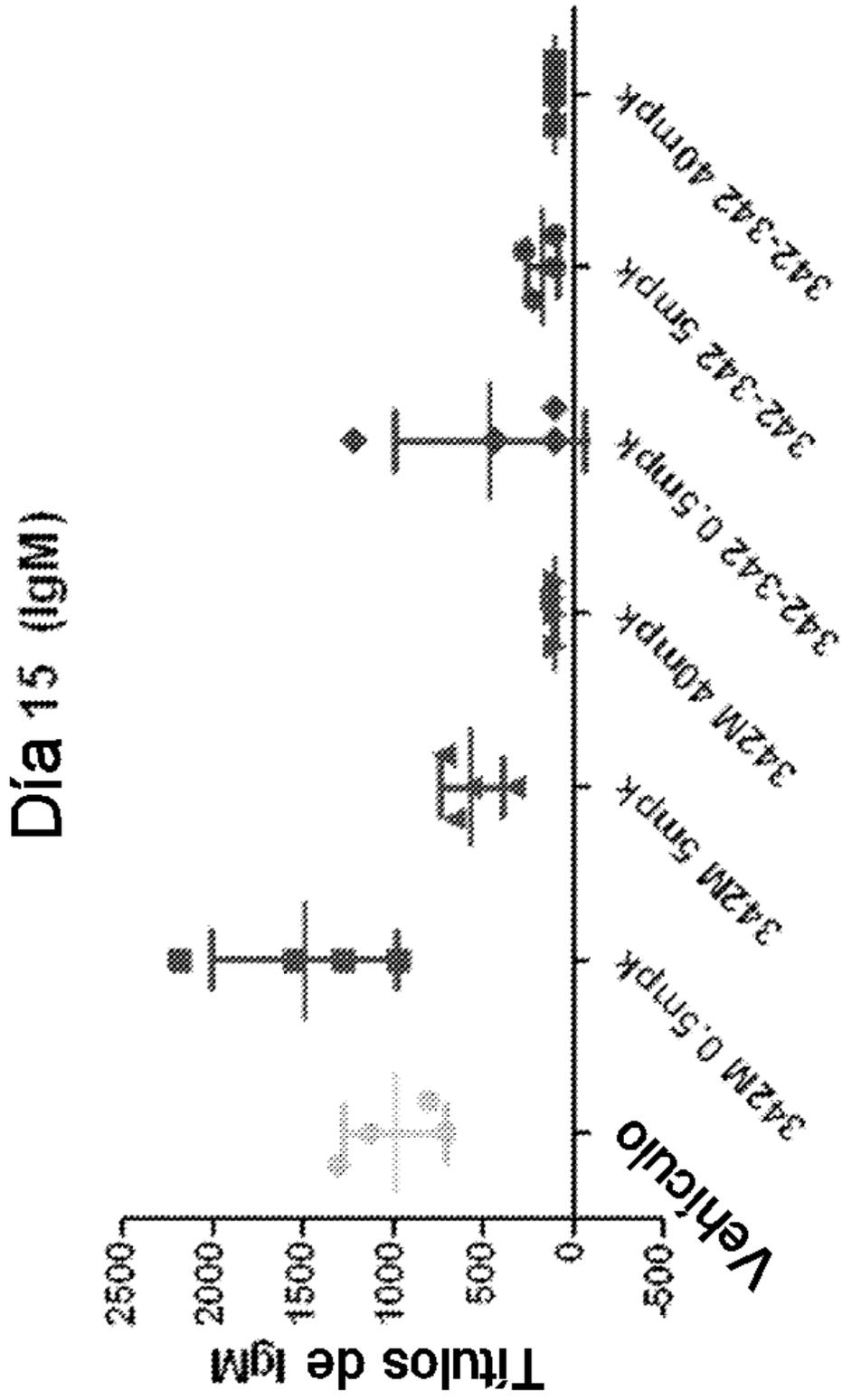


Fig. 5G

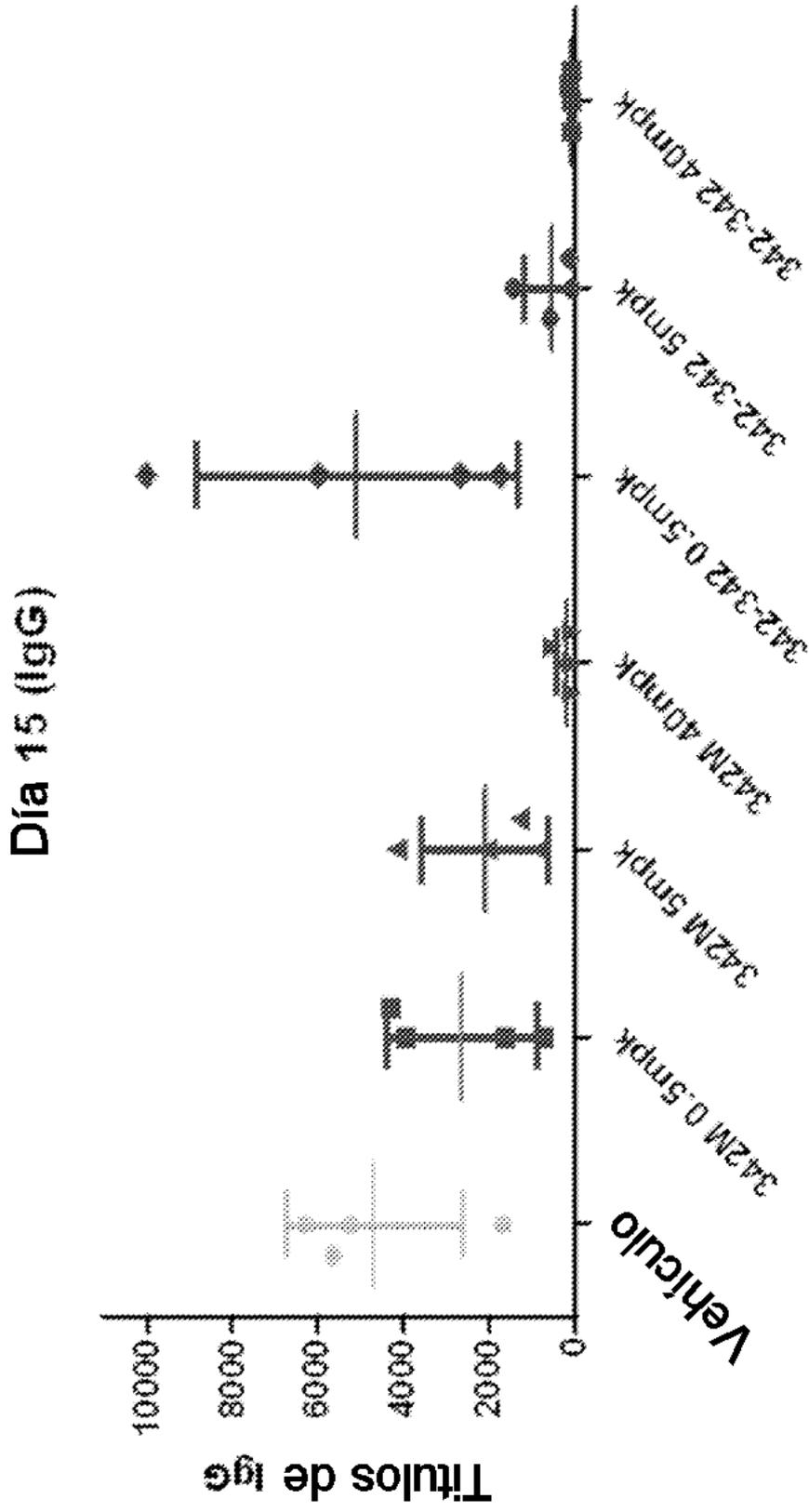


Fig. 5H

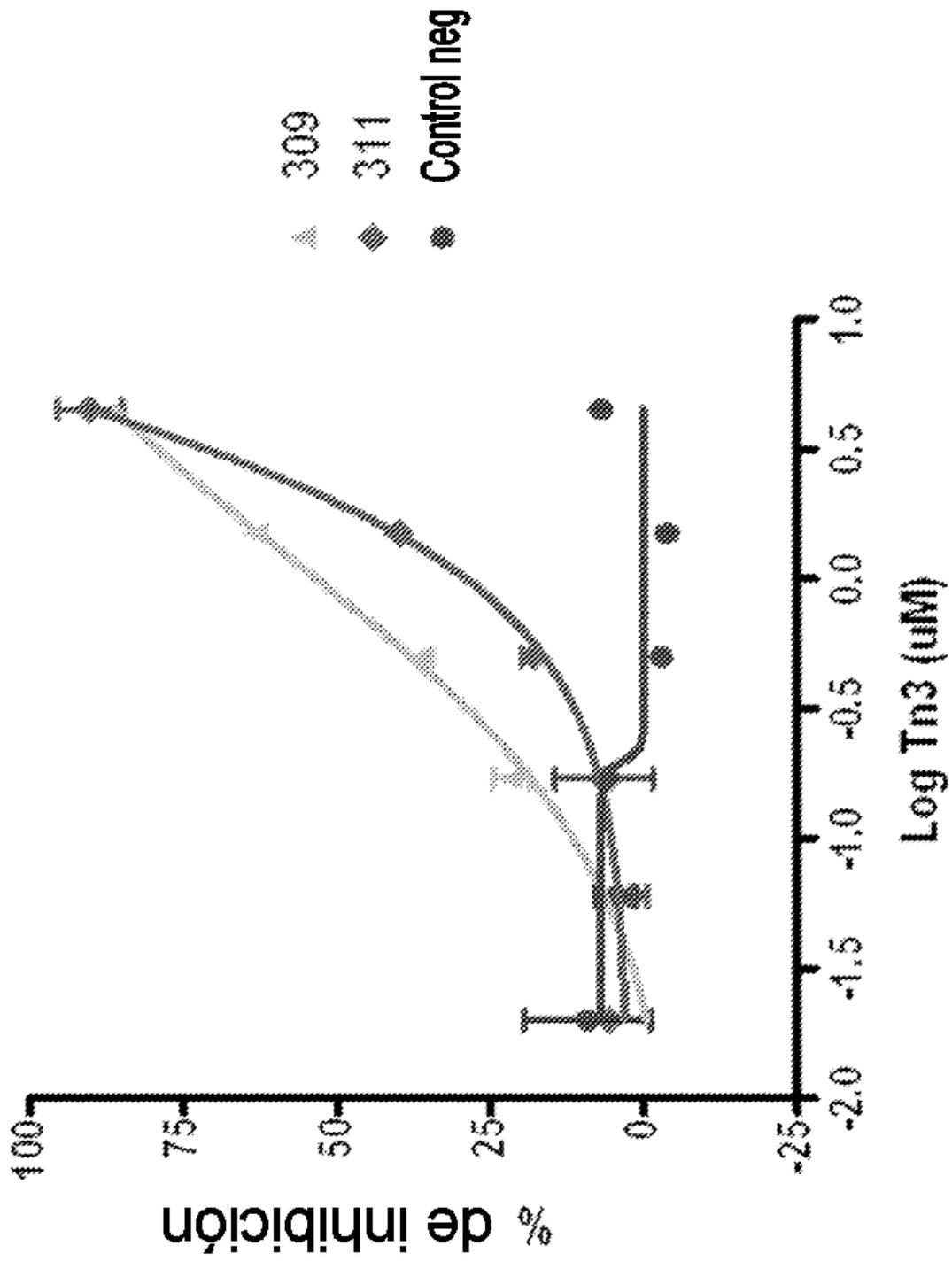


Fig. 6A

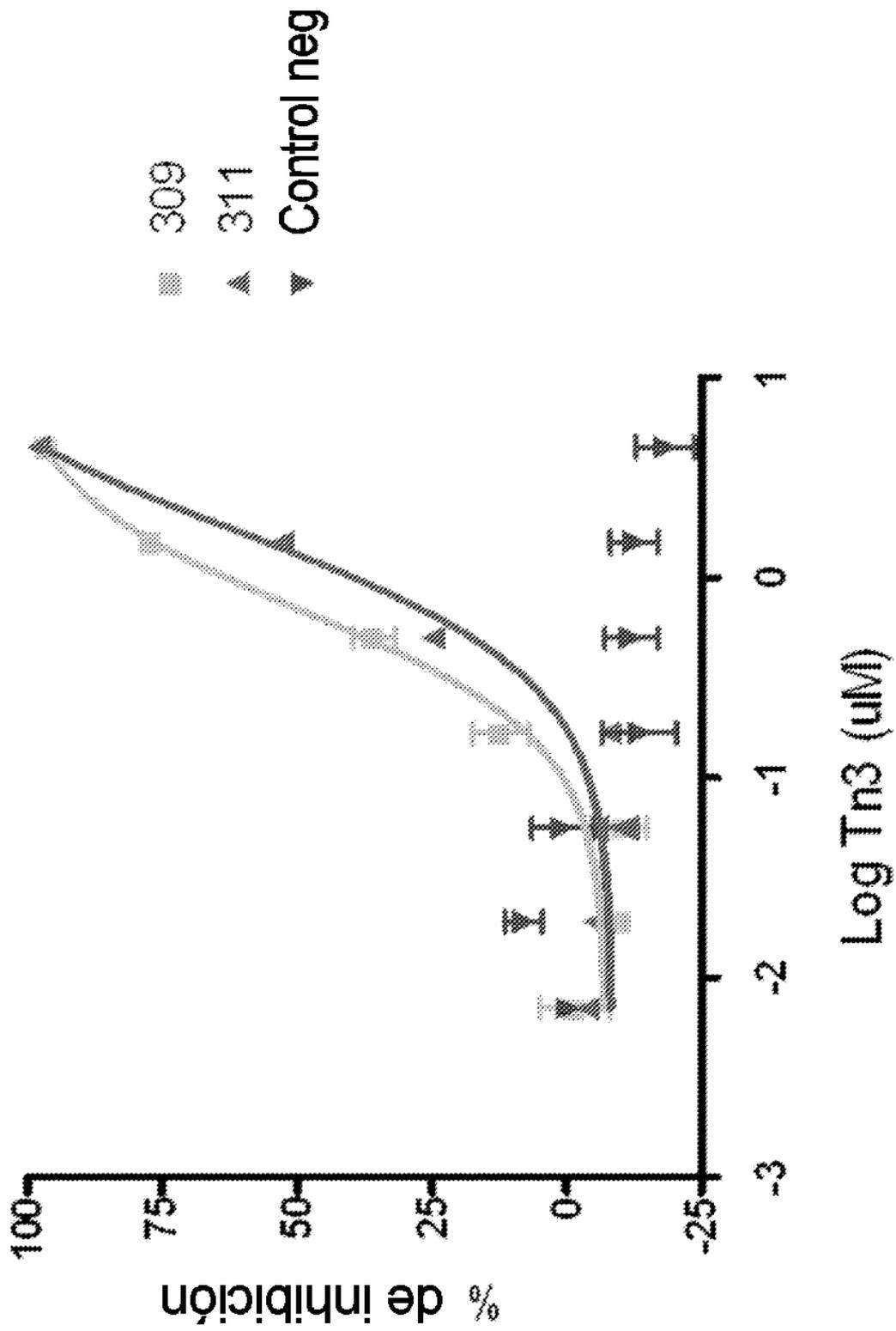


Fig. 6B

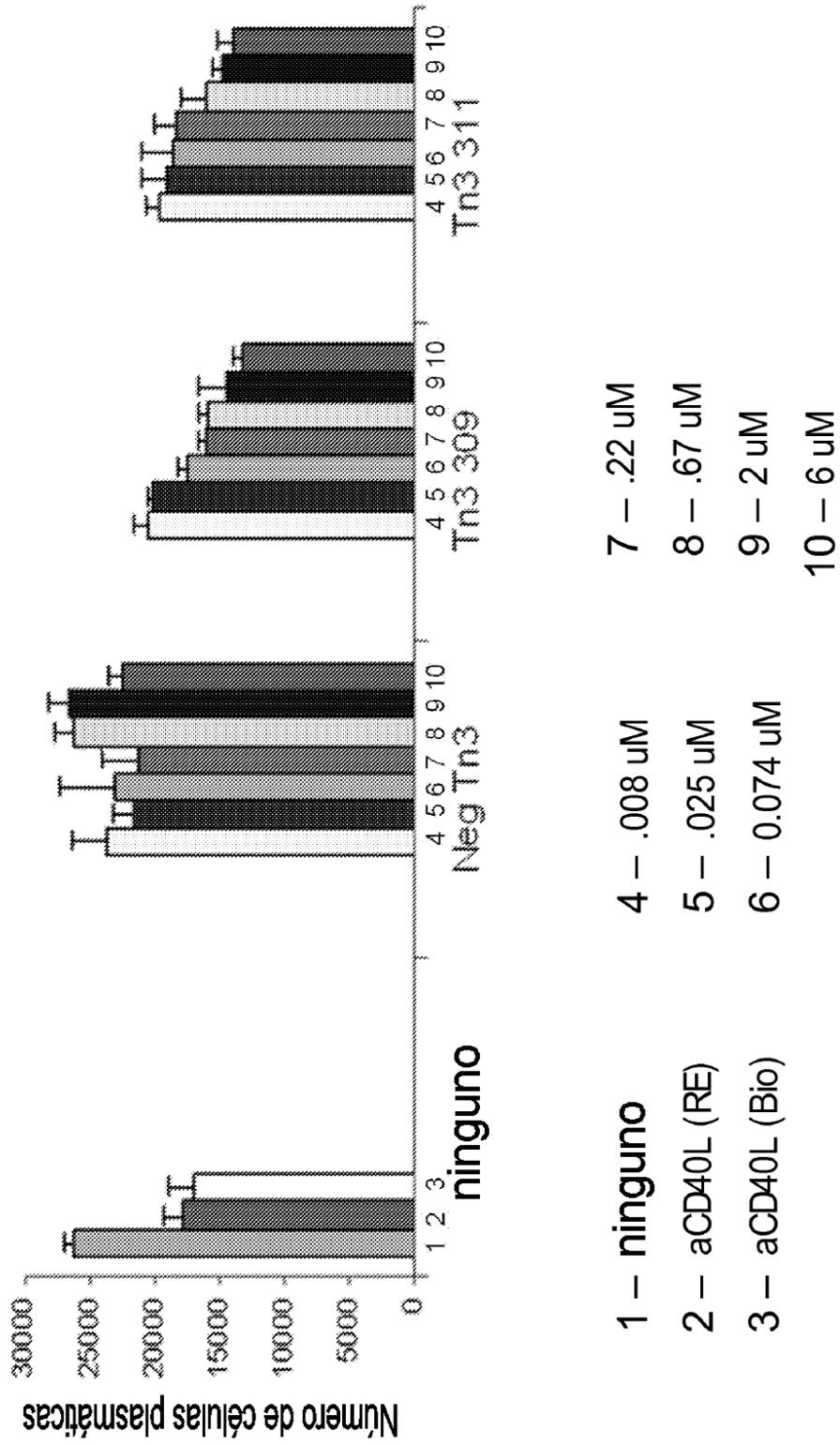


Fig. 6C

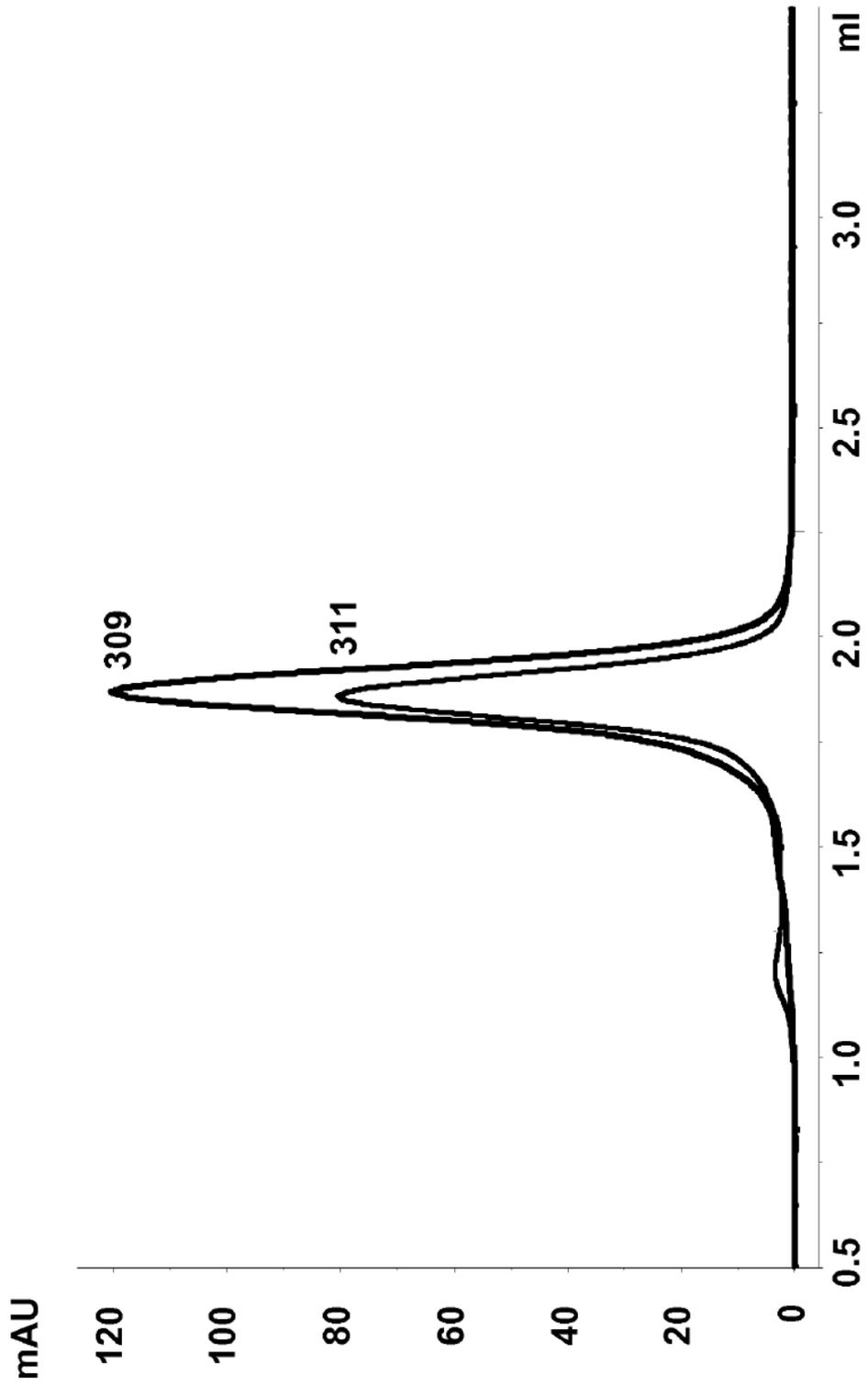


Fig. 7A

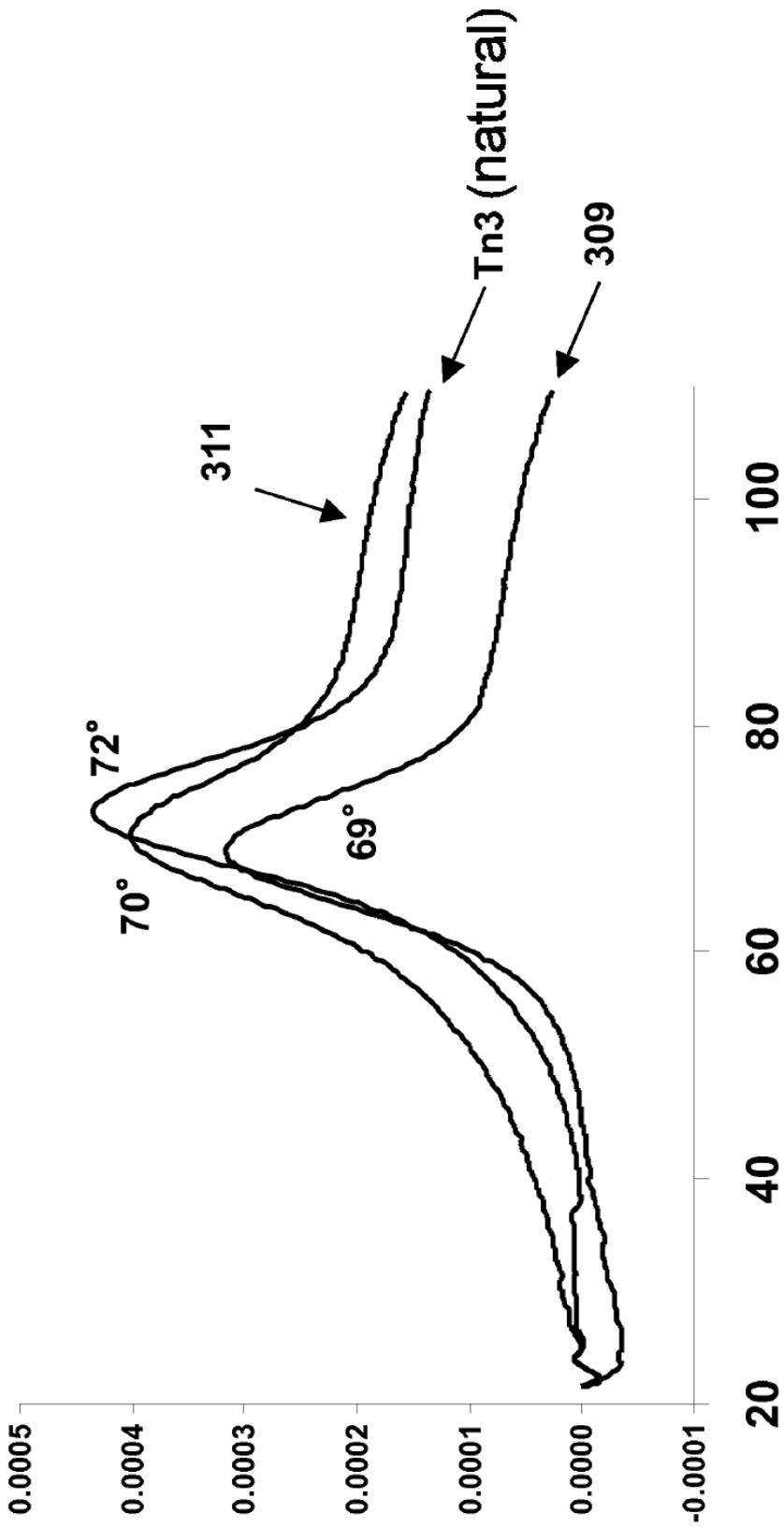


Fig. 7B

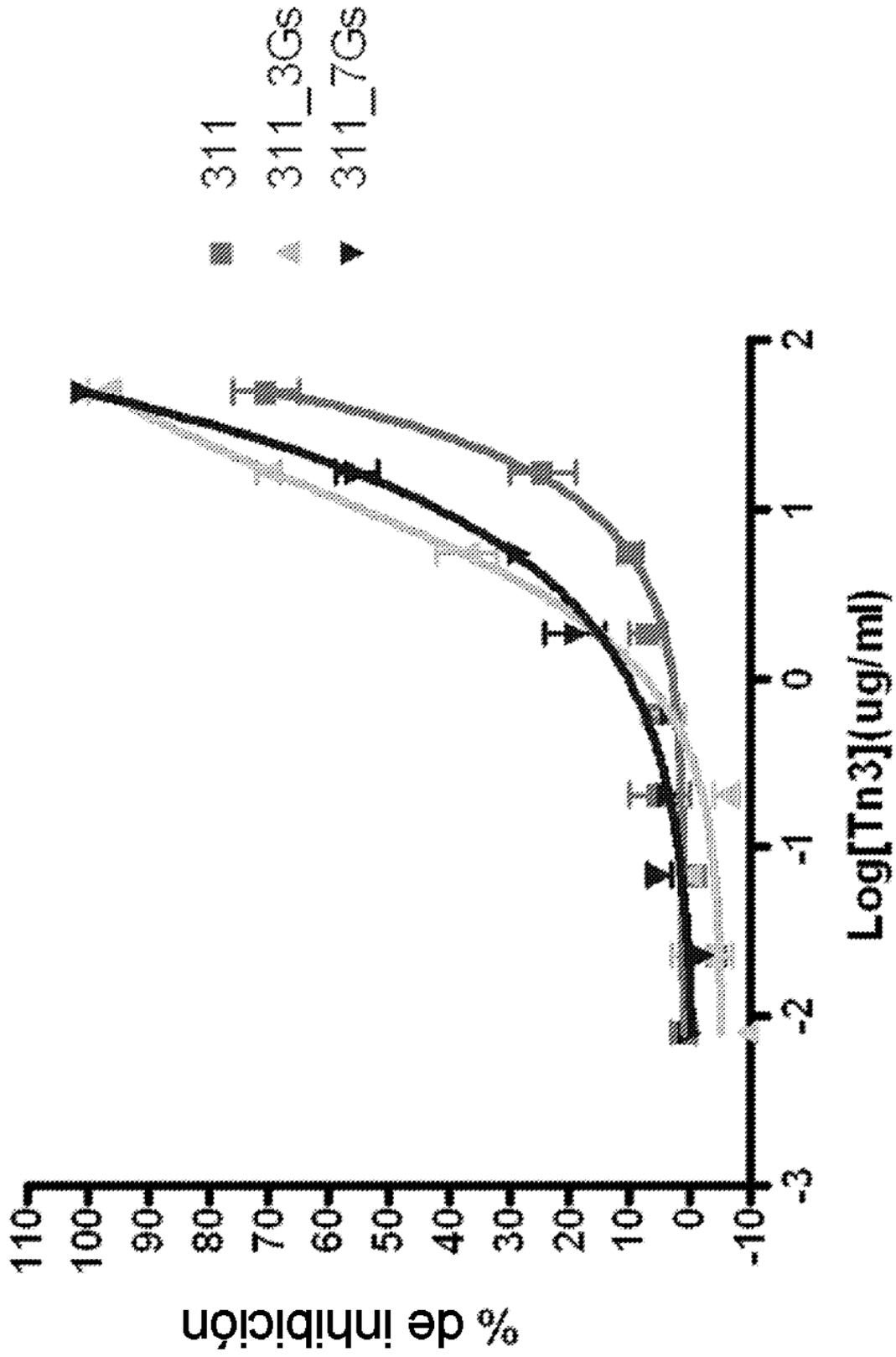


Fig. 8A

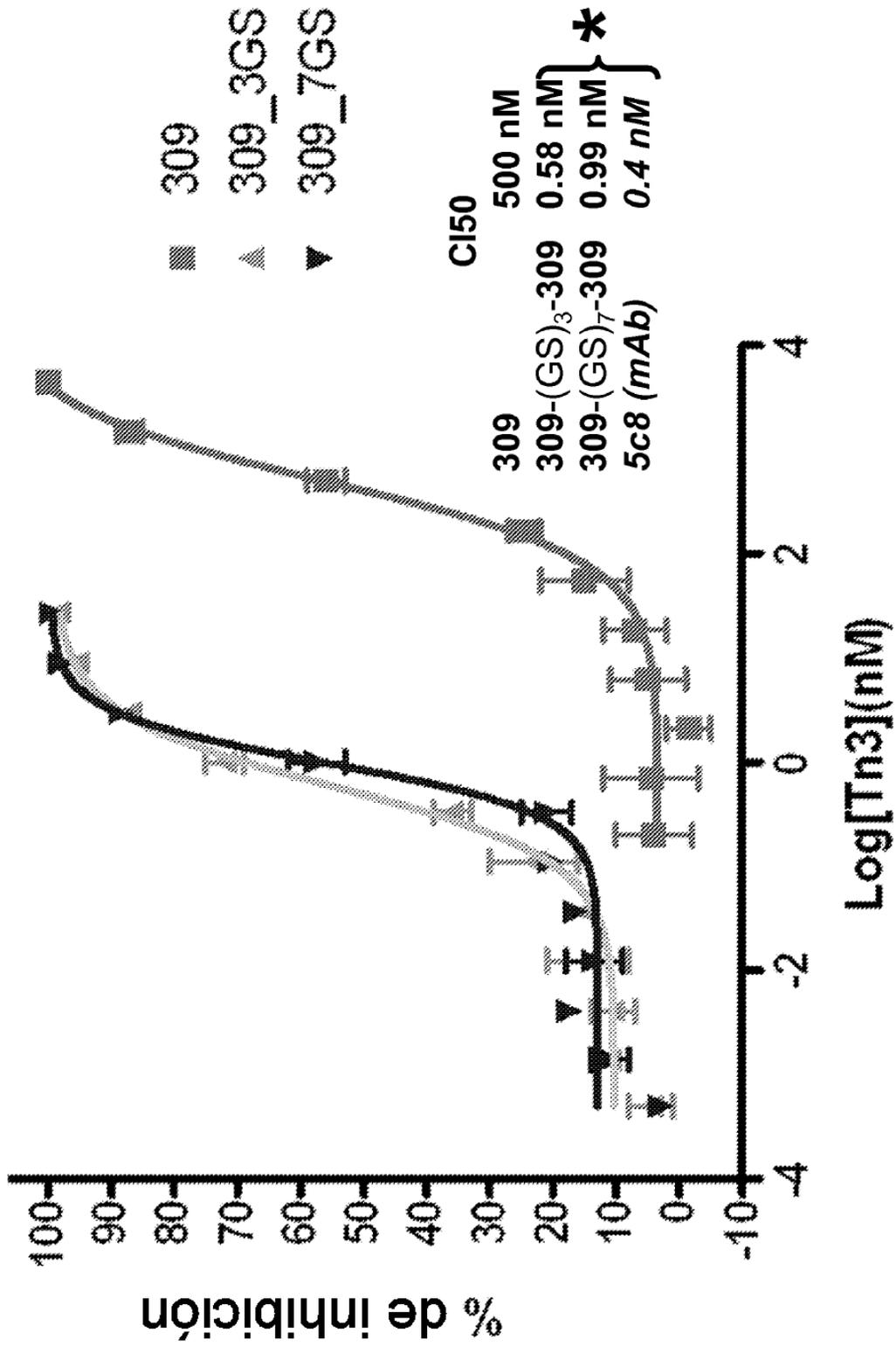


Fig. 8B



X1=S o G o A
X2=R o S o A
N=1-7
M=1-7

Fig. 9A

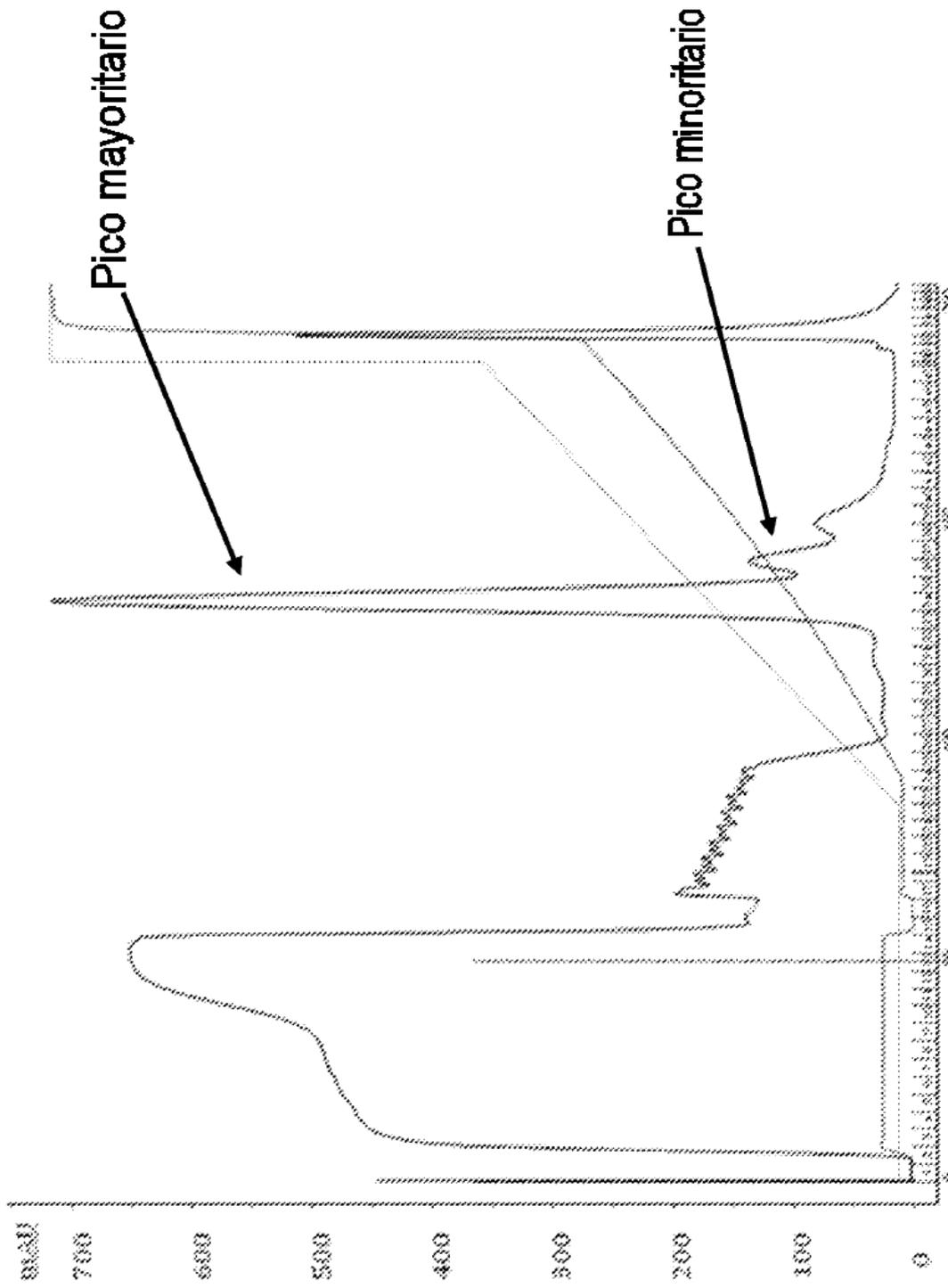


Fig. 9B

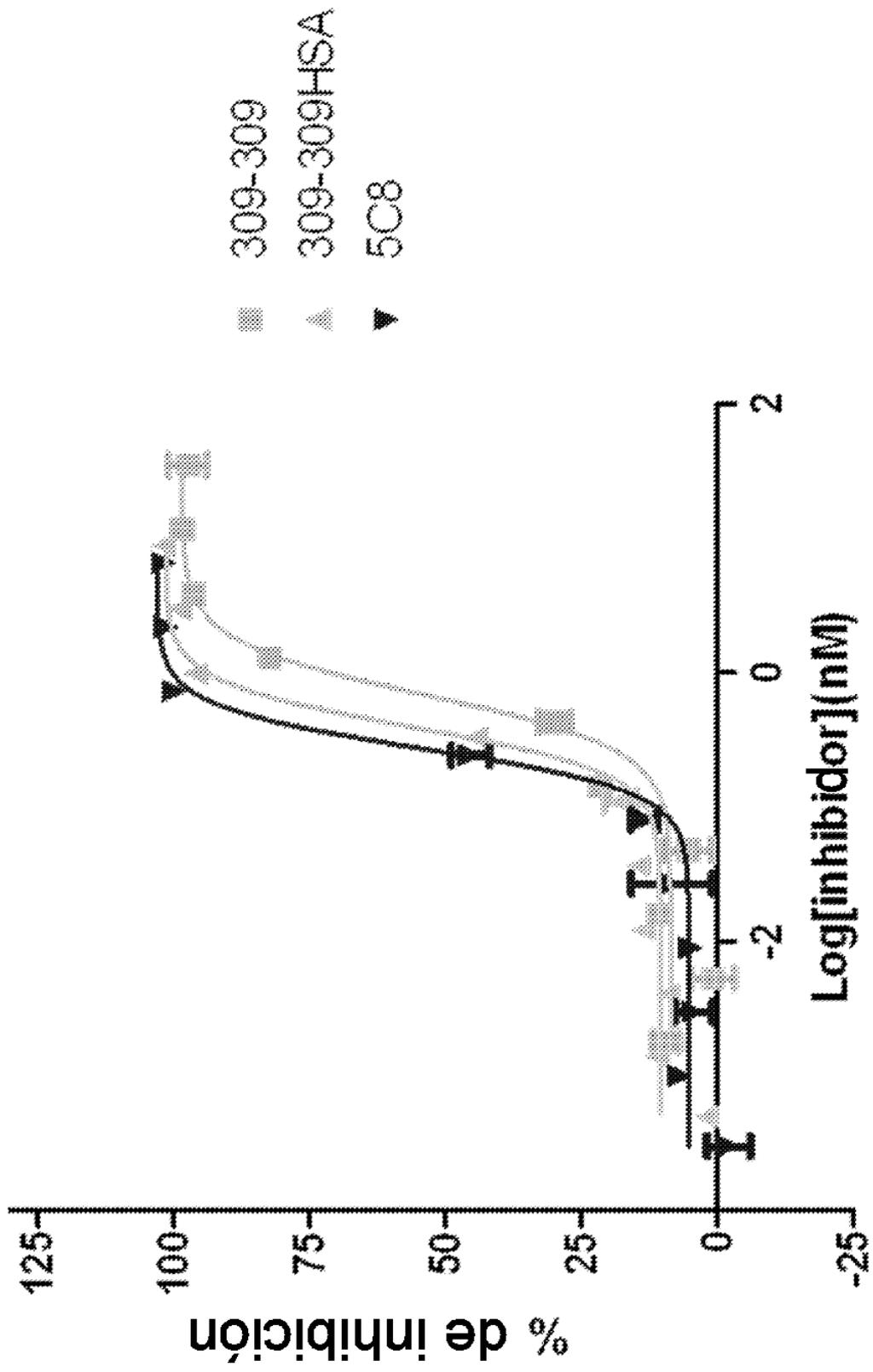


Fig. 9C

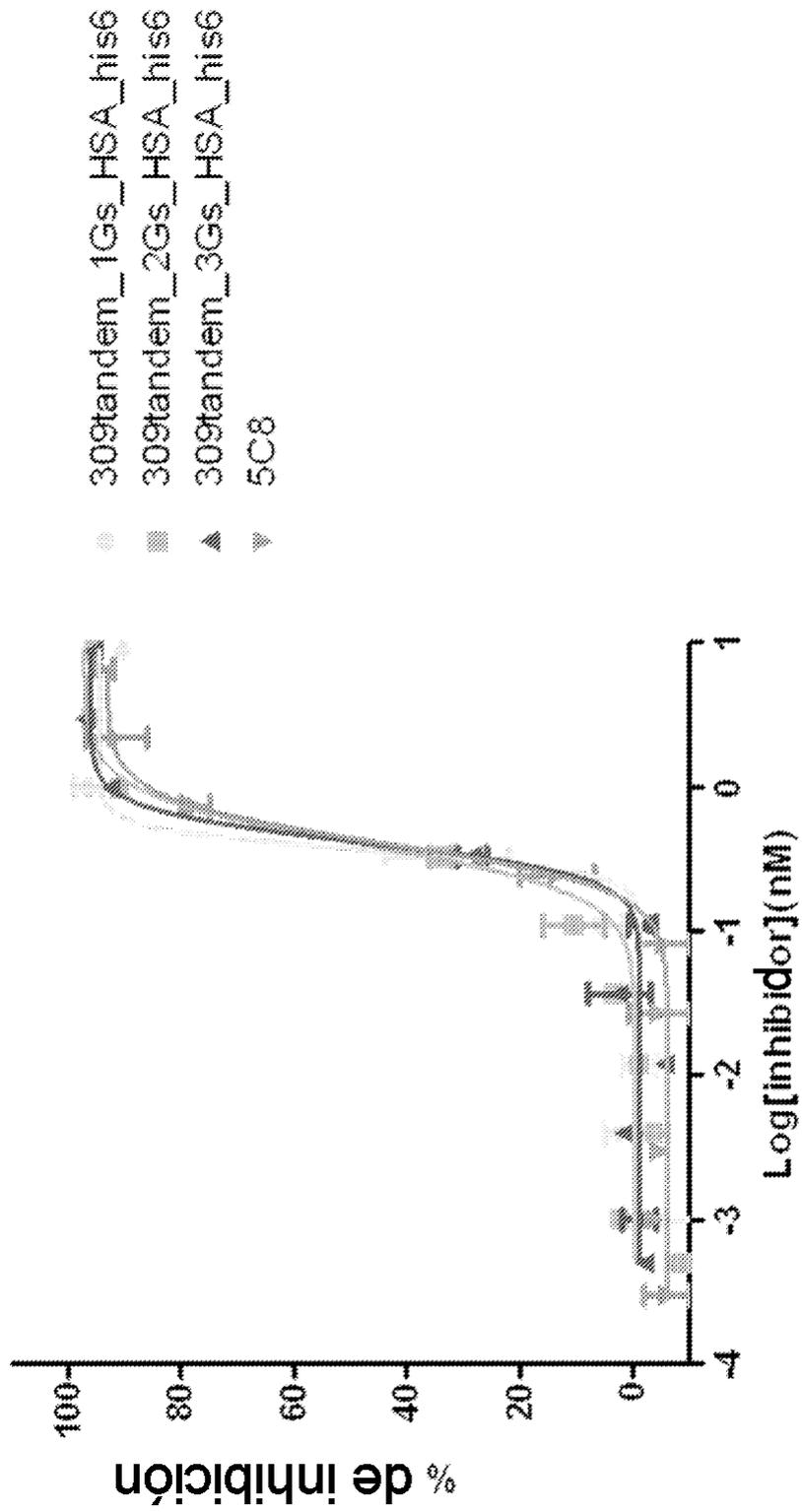


Fig. 9D

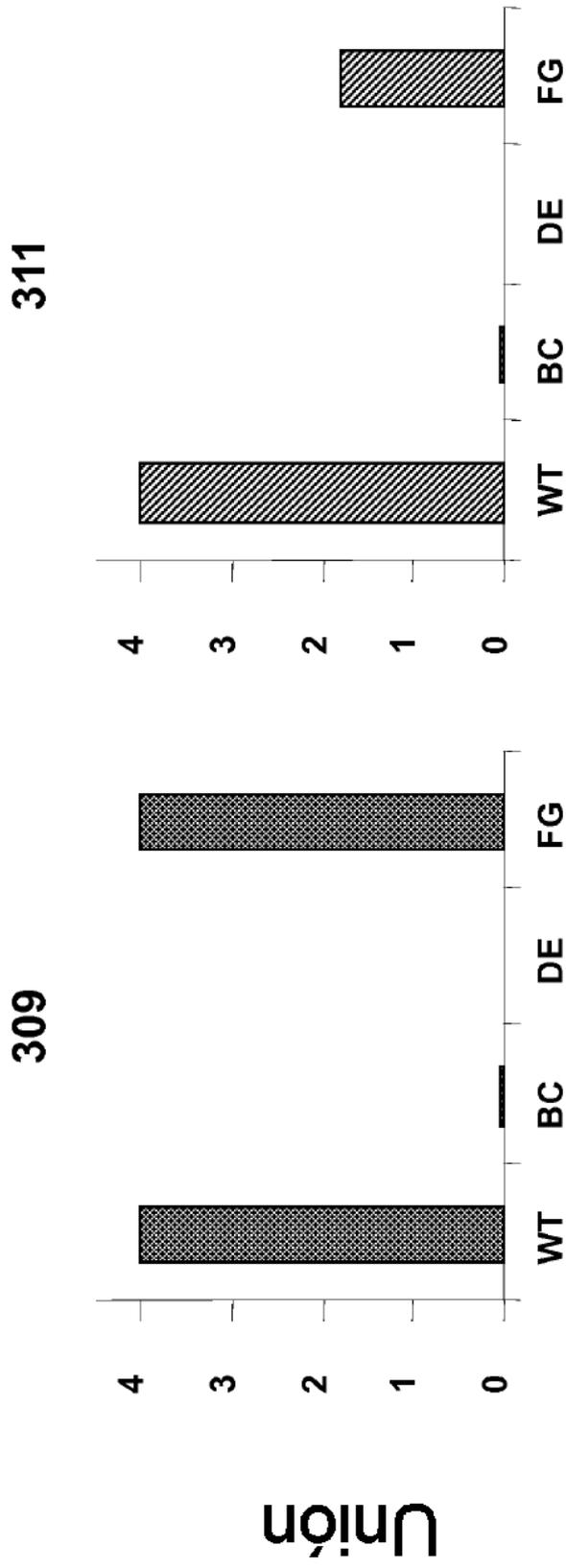


Fig. 10A

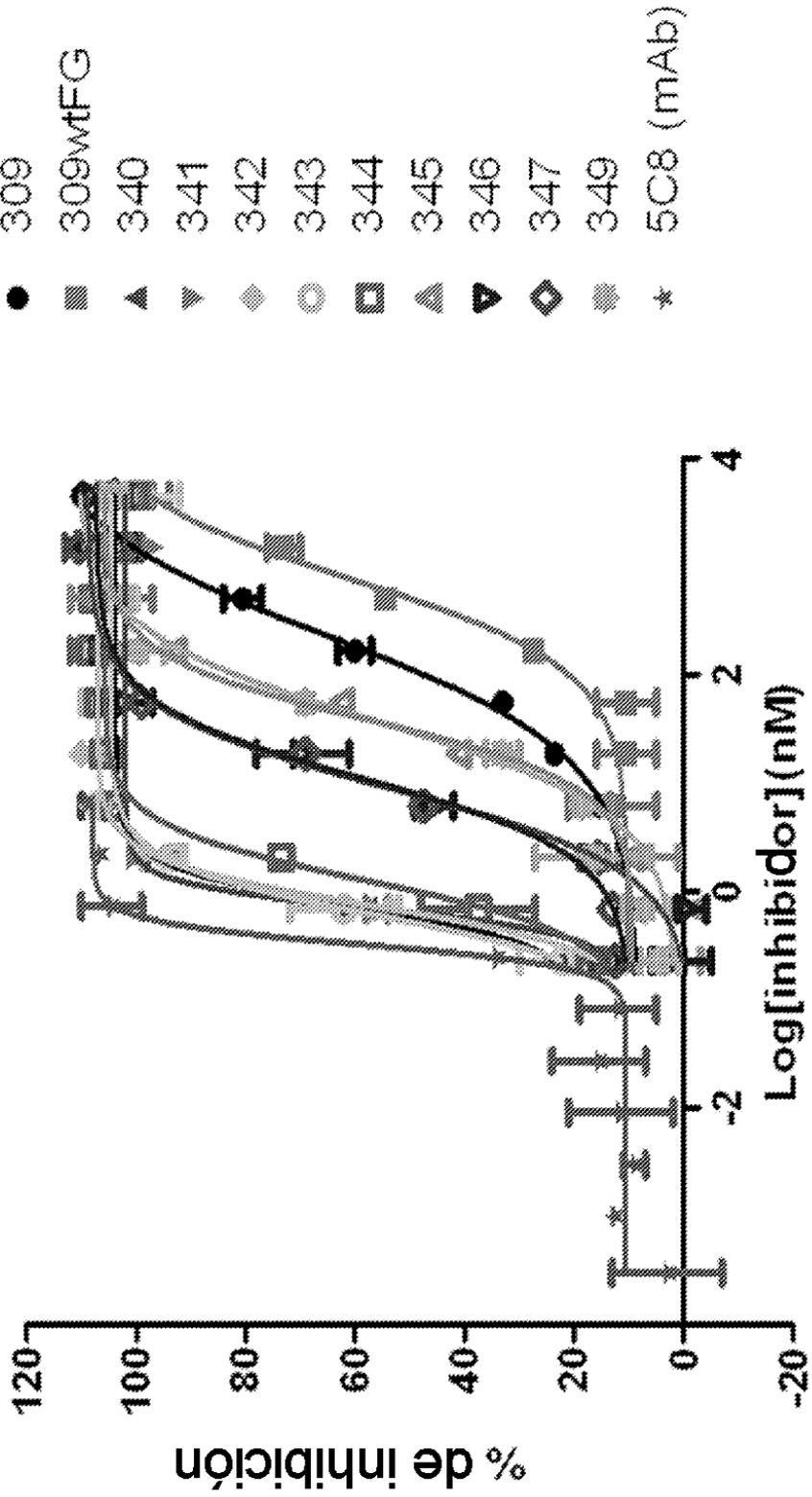


Fig. 10B

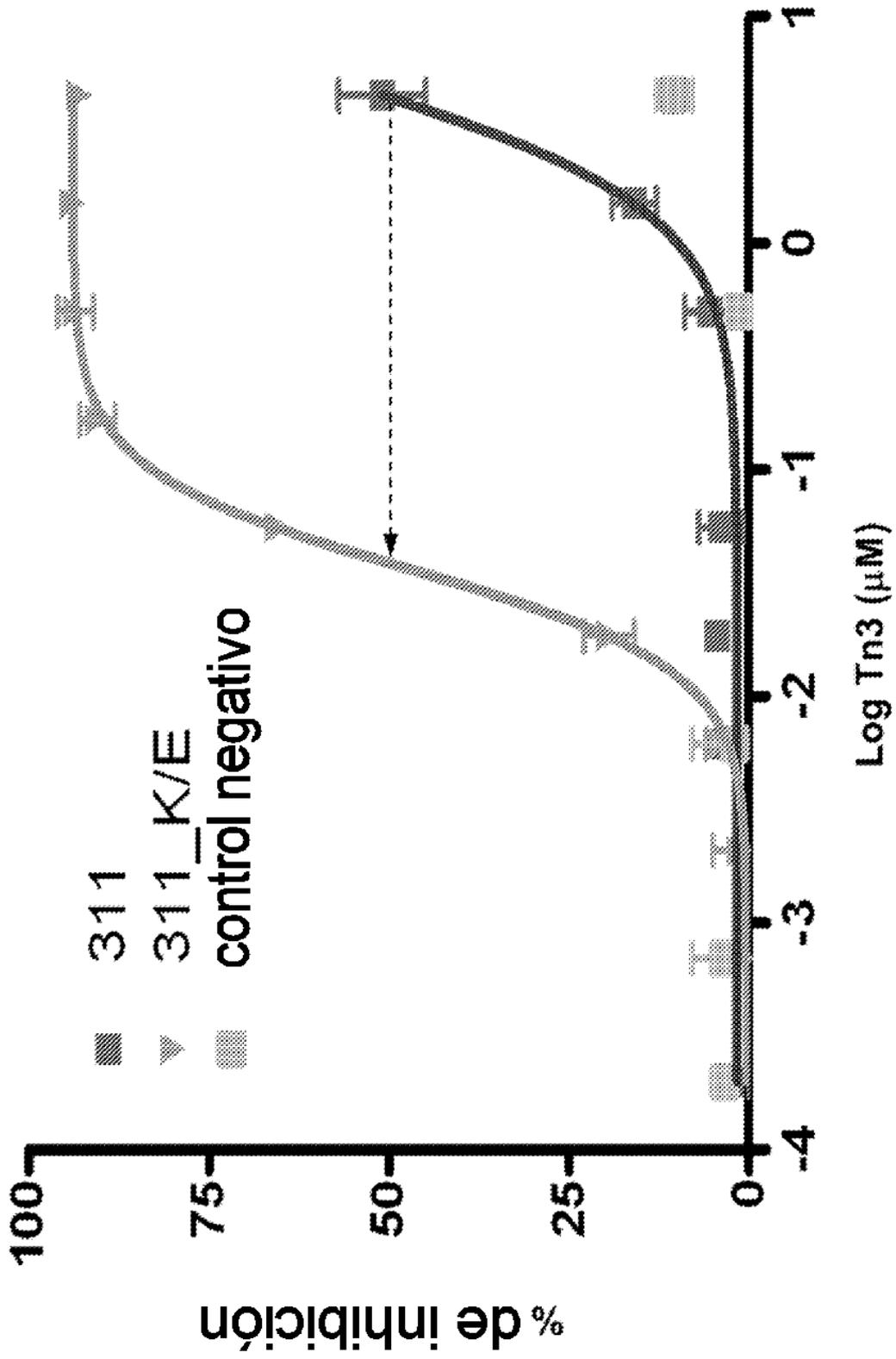


Fig. 10C

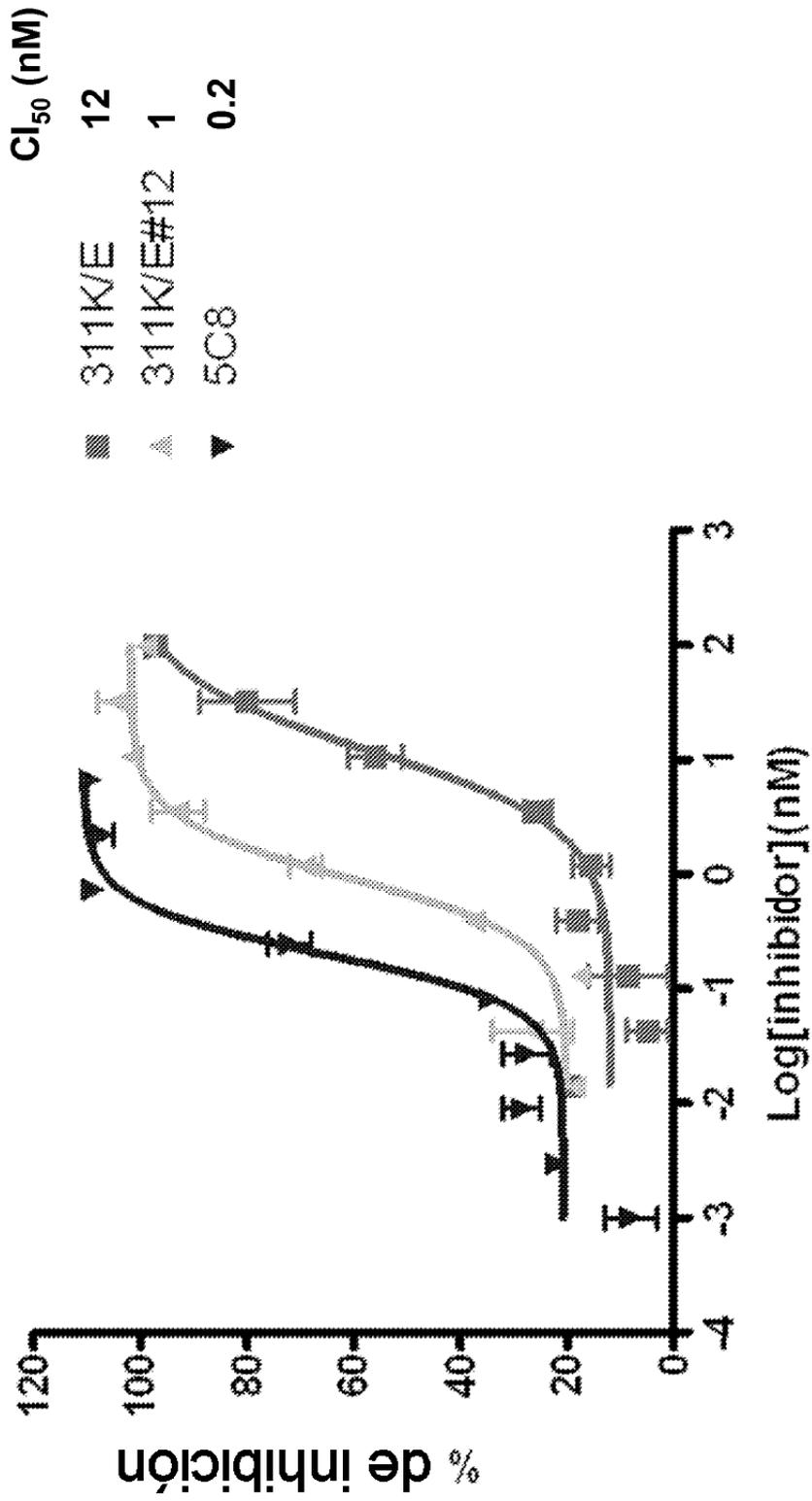


Fig. 10D

309	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E F G H Y D G	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
309FGwt	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E F G H Y D G	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
340	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F D N Y E W	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
341	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F A D Y V W	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
342	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F G E Y V W	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
343	I E V K D V T D T T A L I T W	L D D W G S Y H V	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
344	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E V G D Y V V	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
345	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F A E Y V G	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
346	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F E E Y V V	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
347	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E V G Q Y V G	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
348	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D I G L Y V W	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
349	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E H A E F I G	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
consenso	I E V K D V T D T T A L I T W	X D X X X X X X X	C E E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42

Fig. 11A

309	L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	Y	T	D	O	E	A	G	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83	
309FGwt	L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83	
340	L	W	Y	H	M	A	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83	
341	L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83	
342	L	W	Y	H	A	H	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83	
343	L	W	Y	H	Q	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83
344	L	W	Y	H	M	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83
345	L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83	
346	L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83	
347	L	W	Y	H	M	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83
348	L	W	F	H	Q	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83
349	L	W	H	S	A	W	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	R	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83	
consenso	L	W	X	H	X	A	X	Y	S	I	G	N	L	K	P	D	T	E	Y	E	V	S	L	I	C	R	X	G	D	M	S	S	N	P	A	K	E	T	F	T	T	83

Fig. 11B

	bucle BC																																													
311	I	E	V	K	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	S	Y	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44		
311K4E	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	S	Y	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44		
311K4E_1	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	I	N	R	S	Y	A	D	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44		
311K4E_2	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	I	N	R	S	Y	S	H	L	D	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44		
311K4E_3	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	I	N	R	S	Y	H	N	F	F	H	C	E	L	T	A	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_4	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	Y	S	N	H	L	G	C	E	L	T	A	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_5	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	Y	S	N	F	H	G	C	E	L	T	A	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_7	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	F	Y	S	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_8	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	Y	A	Y	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44		
311K4E_9	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	I	N	R	S	S	Y	A	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_10	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	S	Y	A	N	Y	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_11	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	S	Y	A	N	L	P	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_12	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	S	Y	S	N	L	H	G	C	E	L	T	A	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44
311K4E_13	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	I	N	R	S	S	Y	A	N	L	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_14	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	A	R	S	A	Y	S	H	H	H	Y	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_15	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	S	Y	A	N	Y	H	H	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_16	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	S	Y	S	D	L	P	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_19	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	H	R	S	A	Y	S	N	H	S	F	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_20	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	L	Y	A	N	F	H	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
311K4E_21	I	E	V	E	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	T	N	R	S	S	Y	S	N	L	P	G	C	E	L	T	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	
Consenso	I	E	V	X	D	V	T	D	T	T	A	L	I	T	W	X	X	R	S	X	Y	X	X	X	X	X	C	E	L	X	Y	G	I	K	D	V	P	G	D	R	T	T	I	D	44	

Fig. 12A

	bucle DE	bucle FG	
311	LSSP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E	LSSP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_1	LDQI - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_2	LSAAIYVH	LT DGTYSNP	87
311K4E_3	LNSP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_4	LNNI - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_5	LNSP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_7	LNQP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_8	LNQP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_9	LSSP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_10	LNQP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_11	LNSP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_12	LNQP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_13	LNSP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_14	LROP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_15	LEL - YVH	LT DGTYSNP	85
311K4E_16	LSSP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_19	LNTP - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_20	LEQV - YVH	LT DGTYSNP	86
311K4E_21	LNVV - YVH	LT DGTYSNP	86
Consenso	LXXXXYVH	LT DGTYSNP	87

Fig. 12B

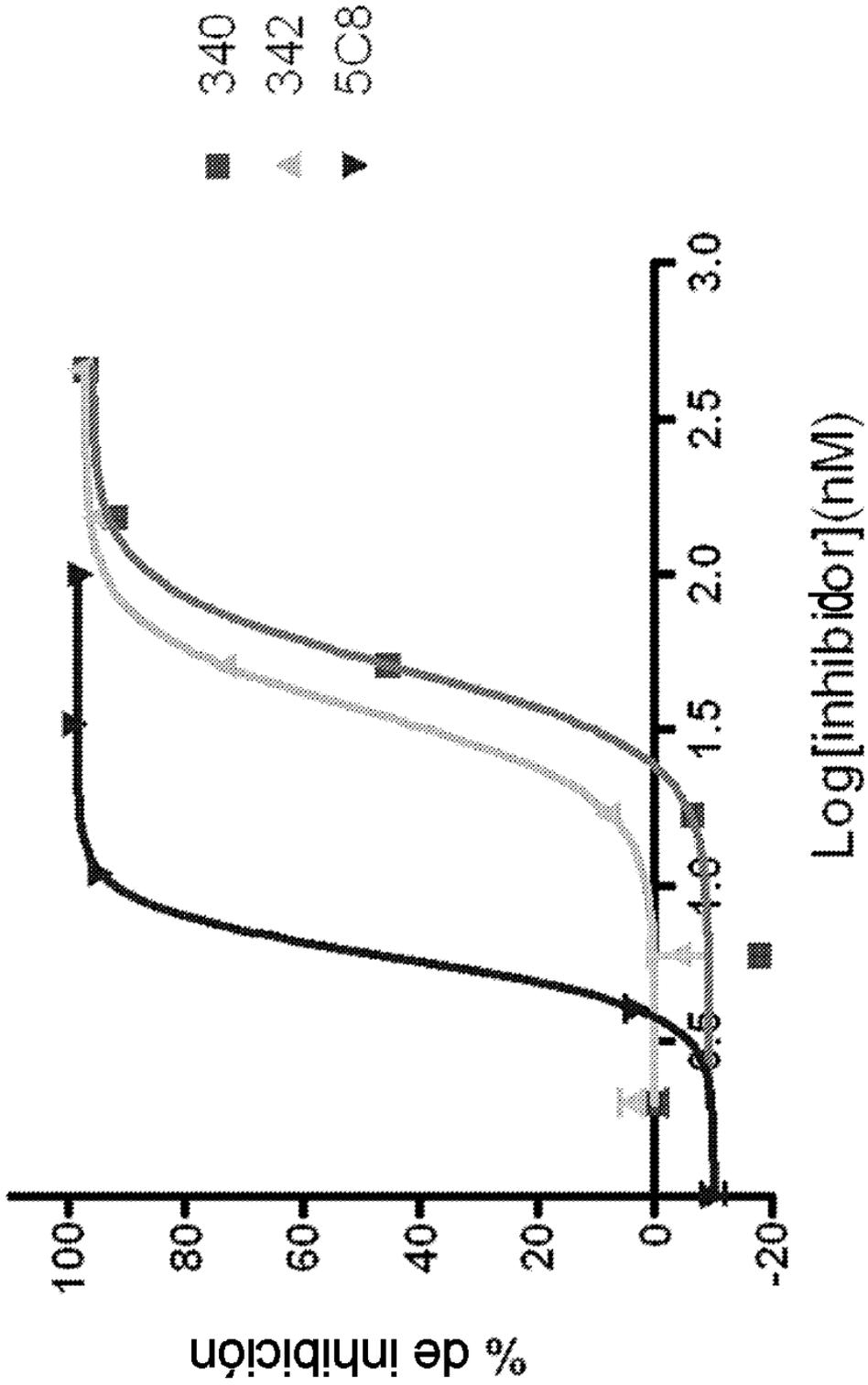


Fig. 13

Unión de anti-CD40L-TN3 a linfocitos T CD4+ activados durante 24 h

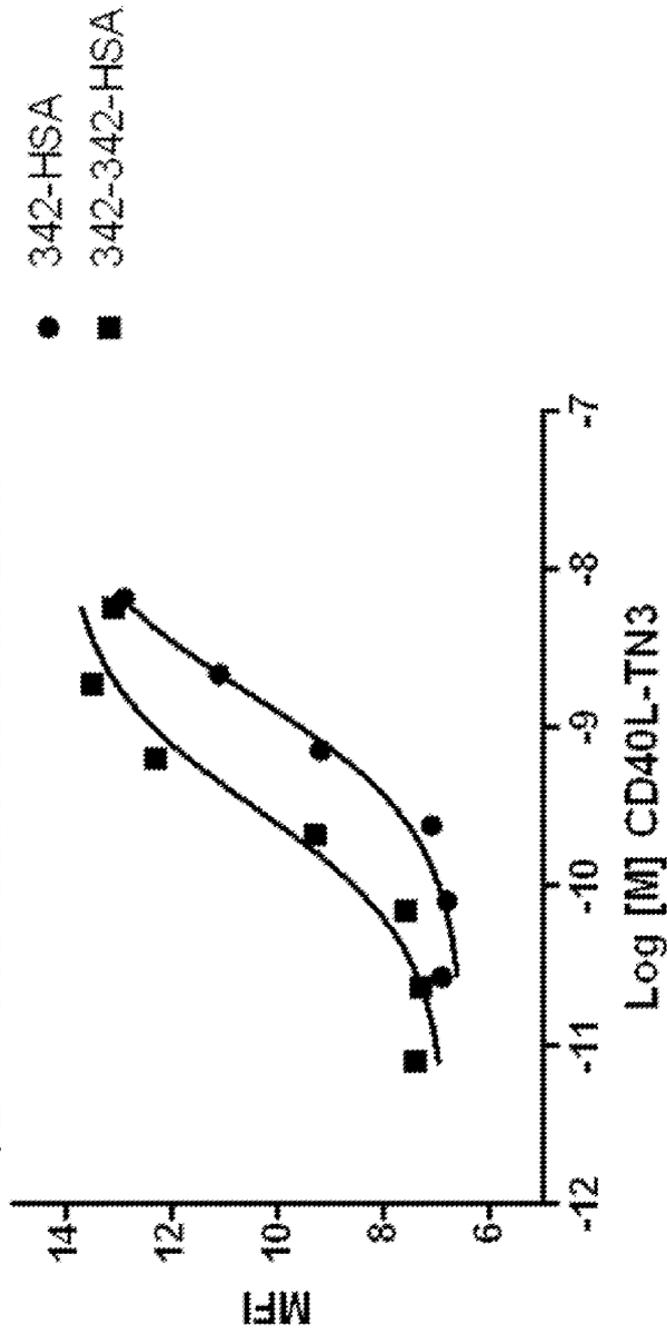


Fig. 14

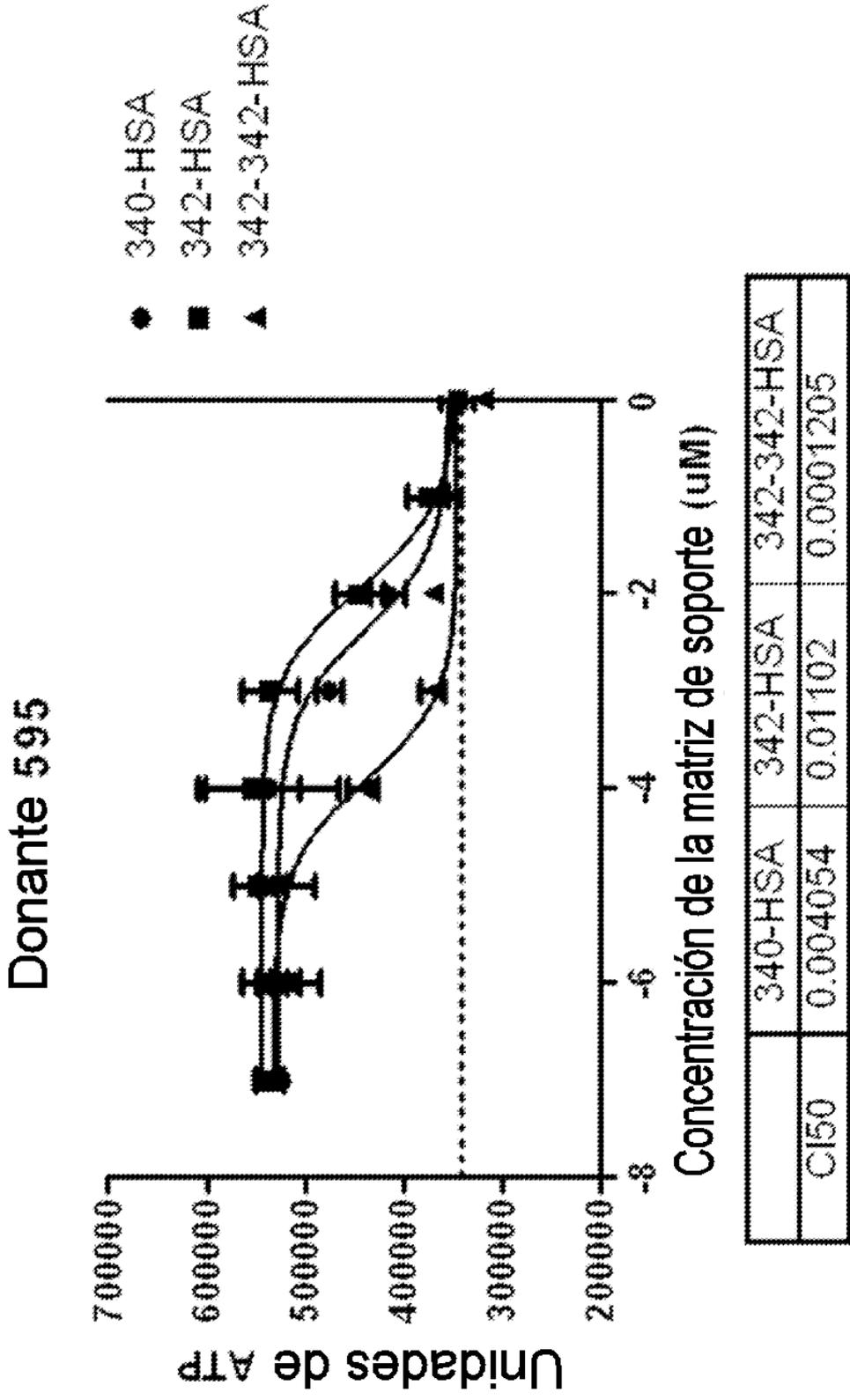


Fig. 15

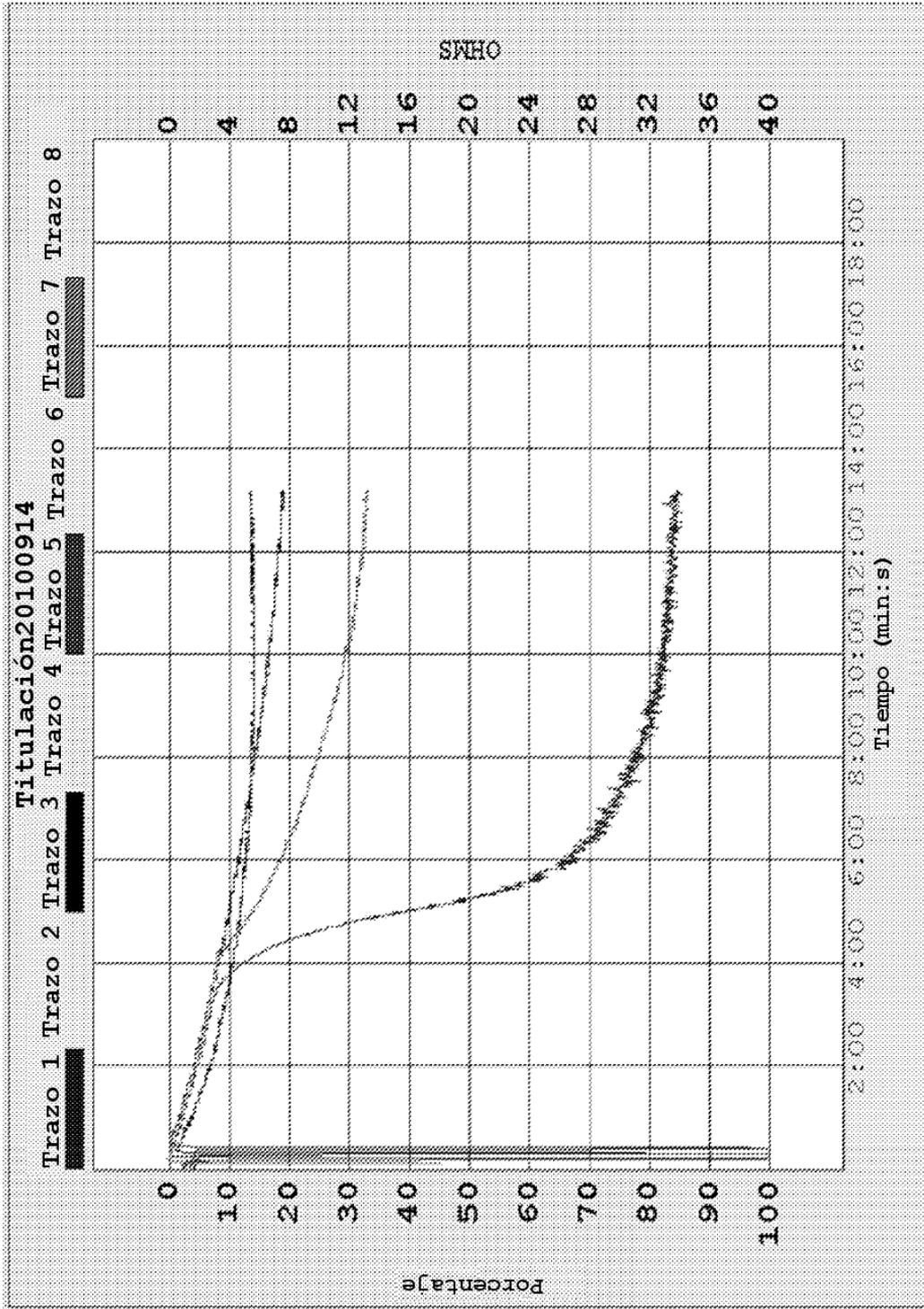


Fig. 16A

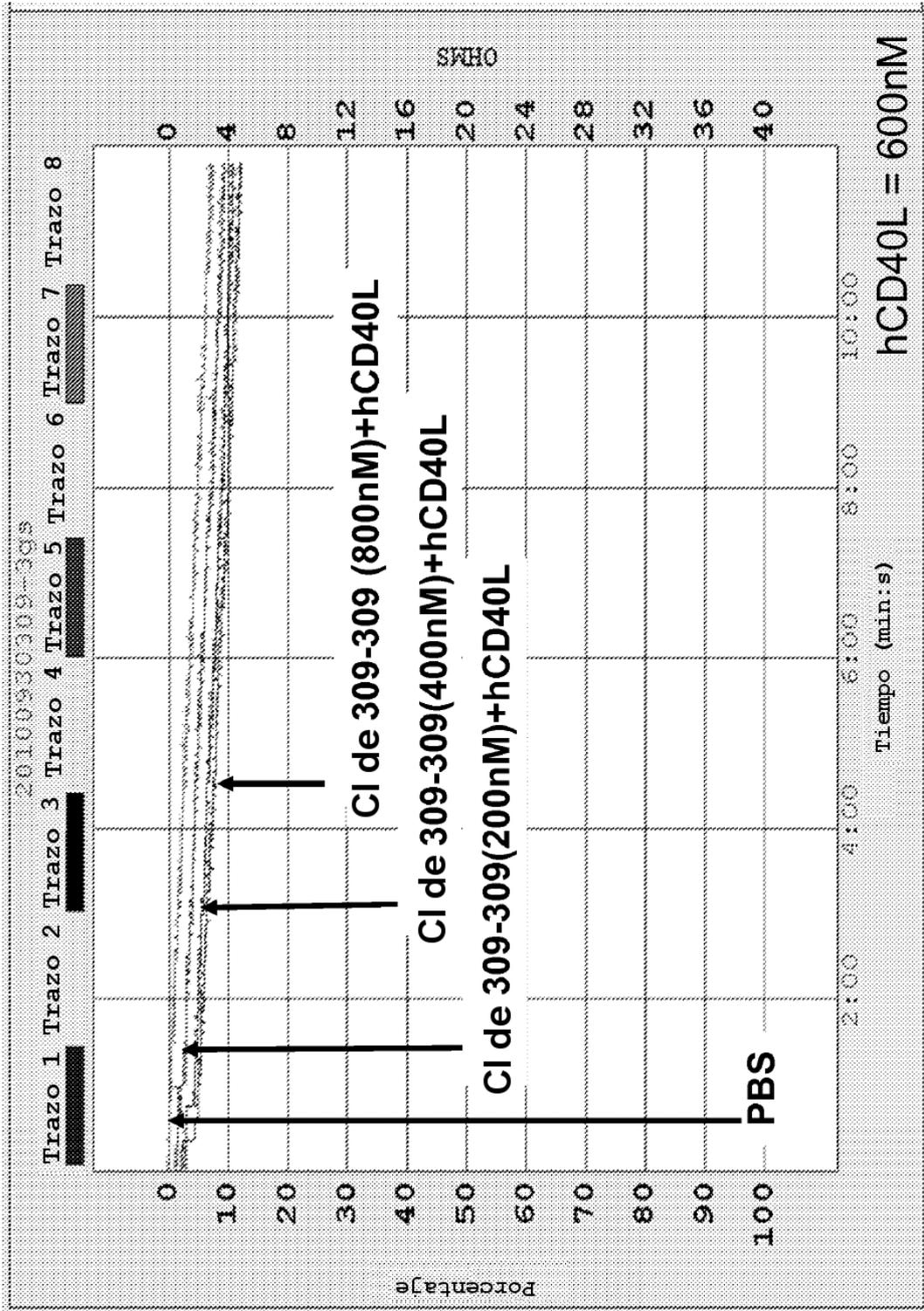


Fig. 16B

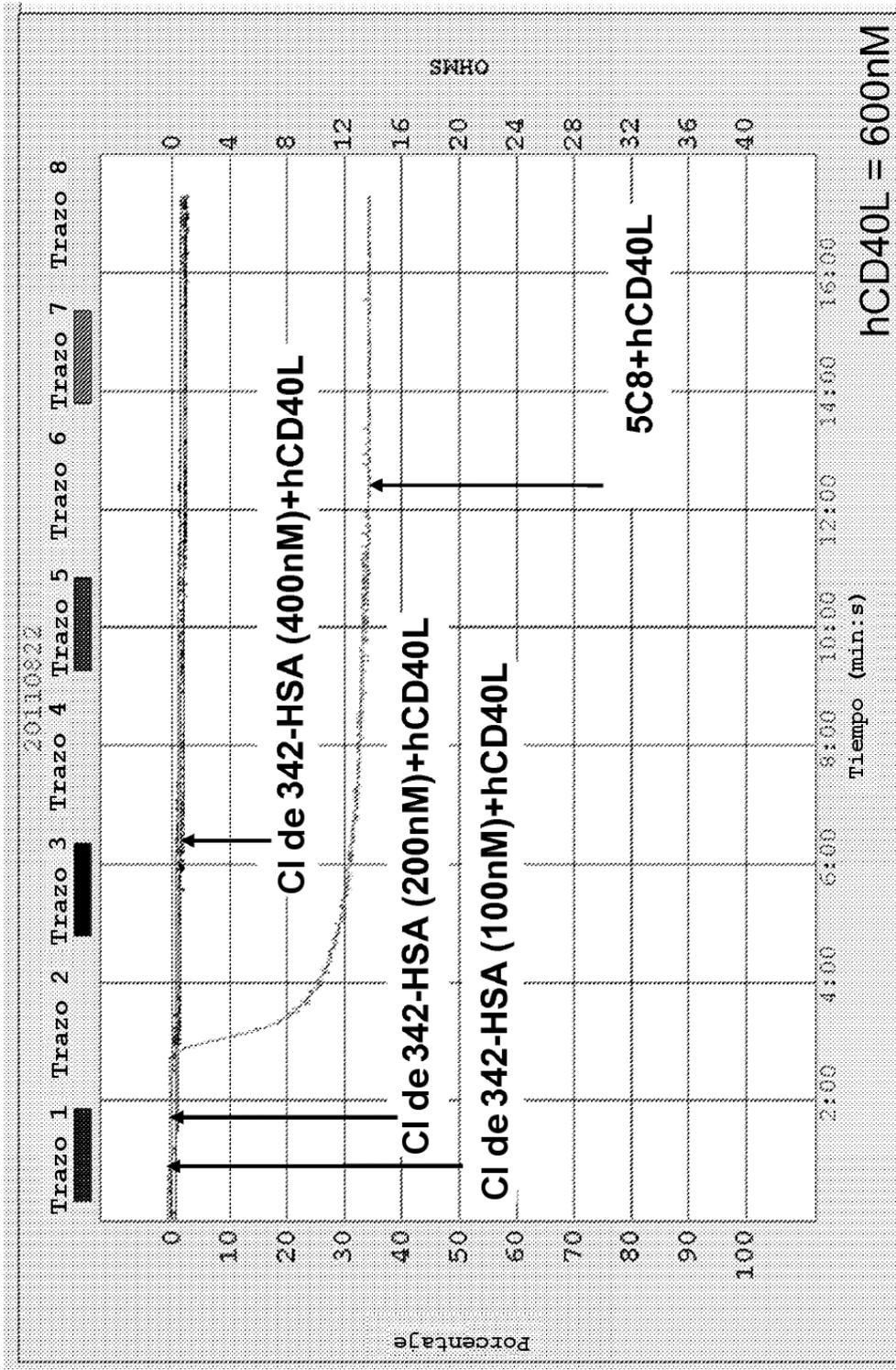


Fig. 16C

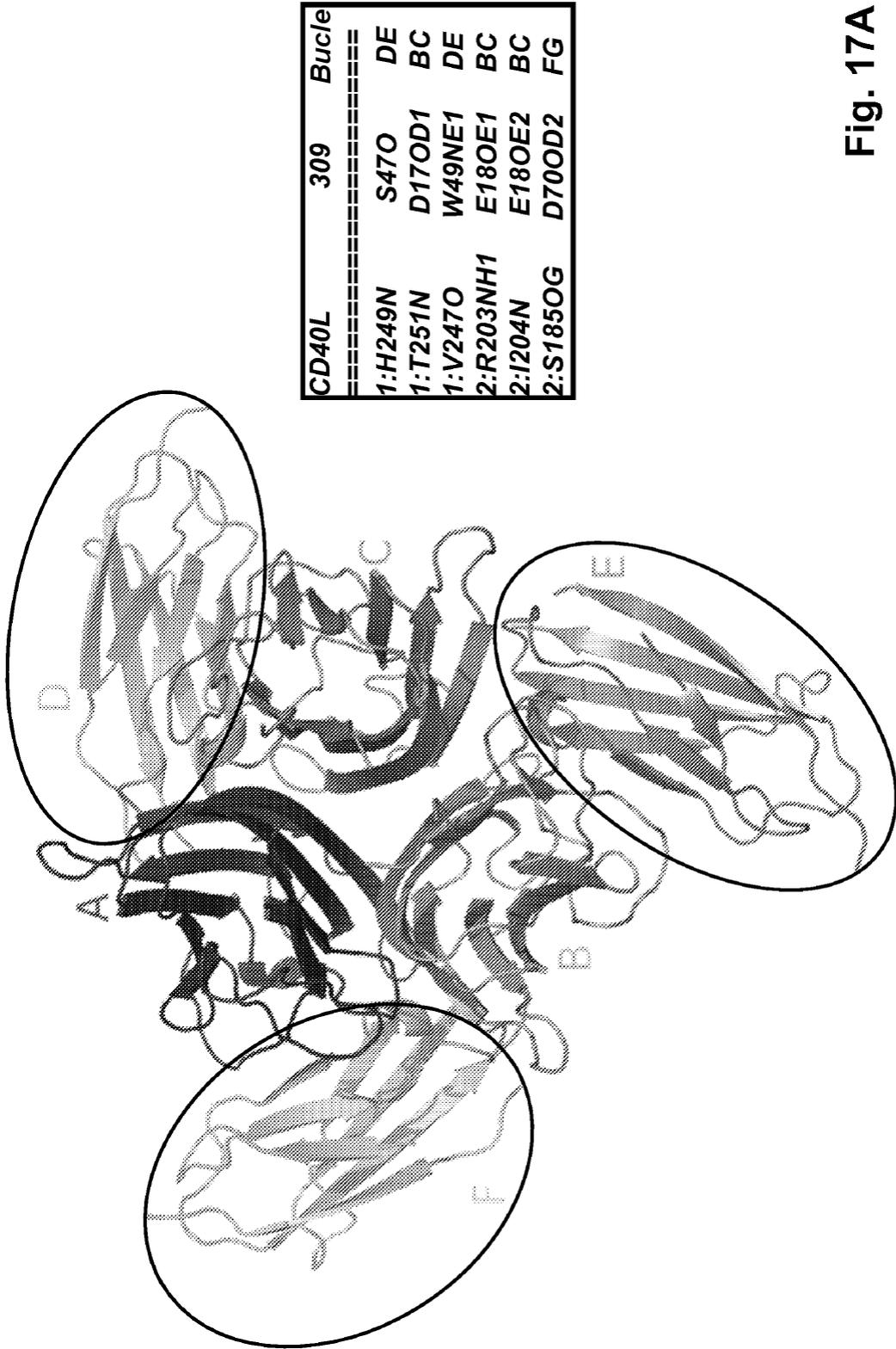


Fig. 17A

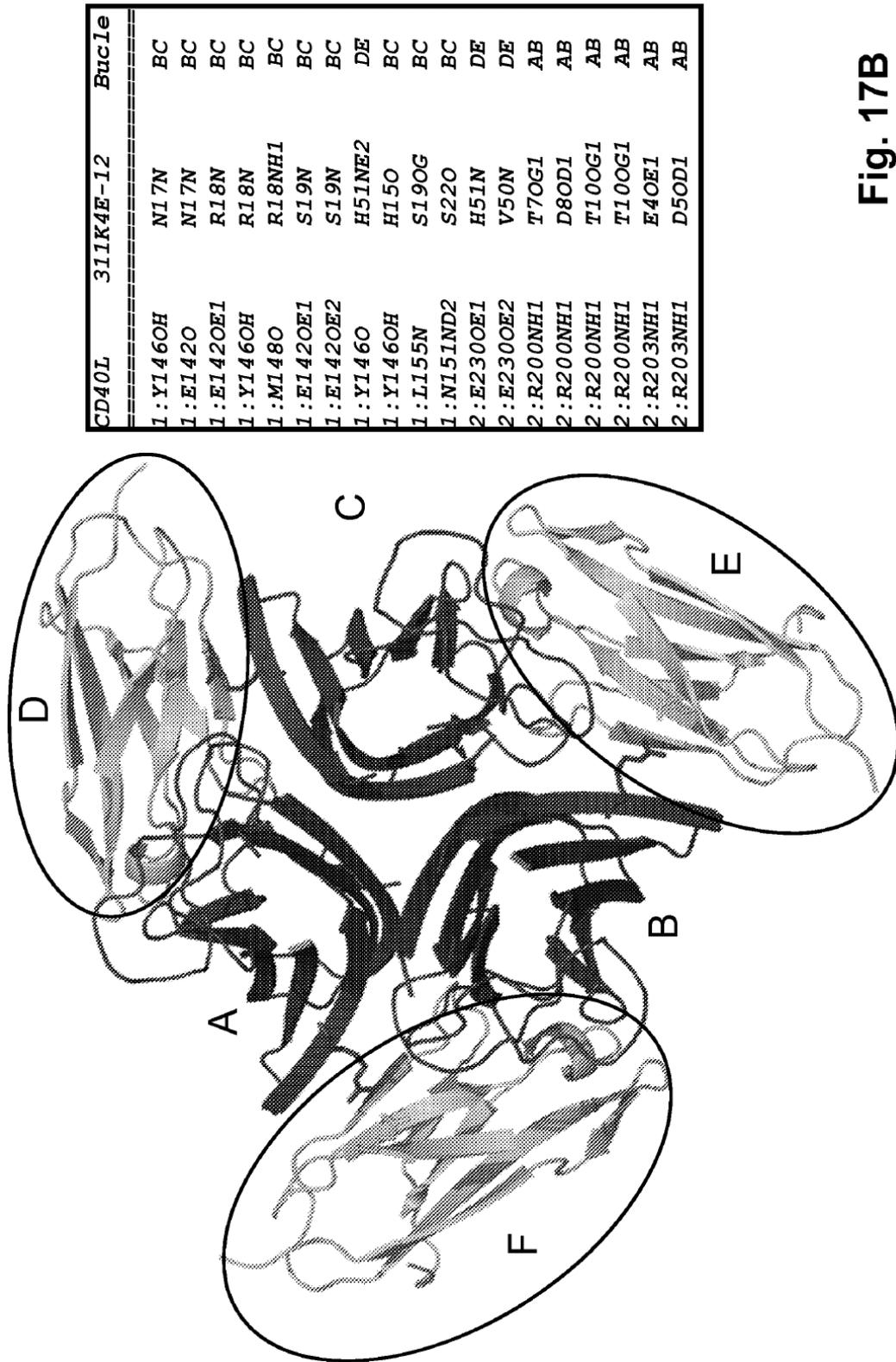


Fig. 17B

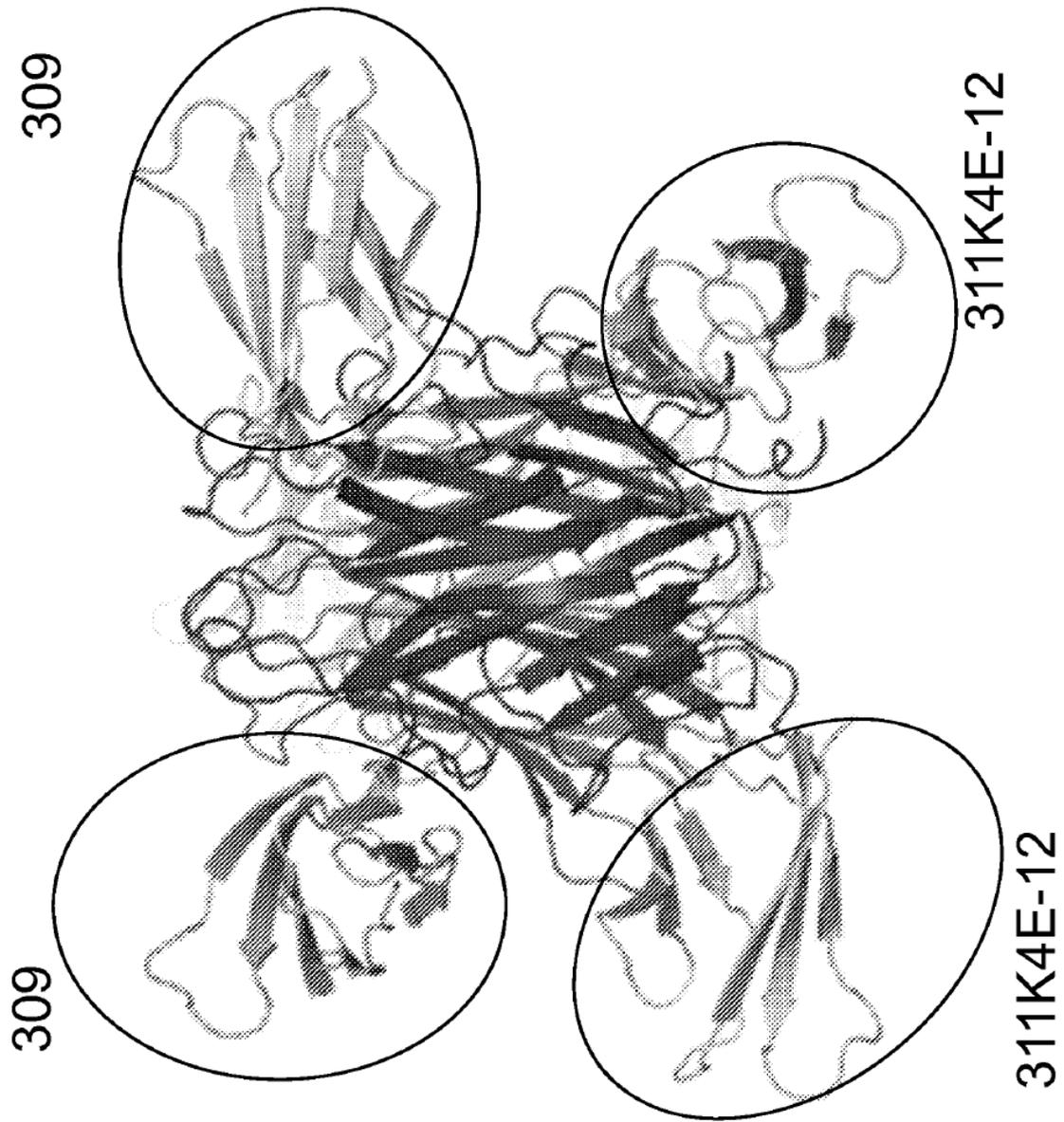


Fig. 17C

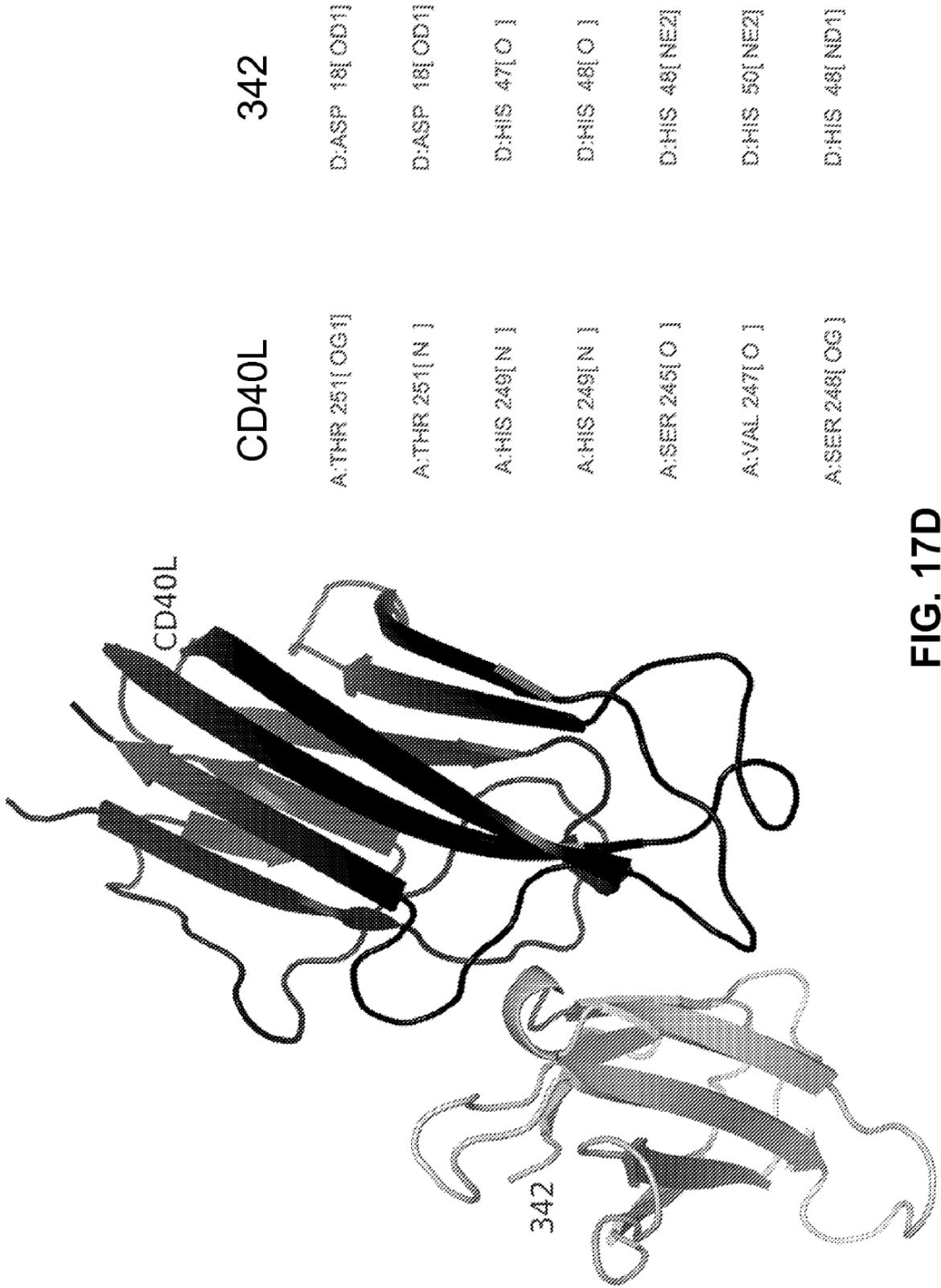


FIG. 17D



FIG. 17E

MIETYNQISE RSAATGLPIS MKIEMLLTV FLITQMIGSA LEAVYLHRRRL DKIEDERNLH 60
 EDEVEMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEINSQ FEGEVKDIML NNEETKNENS FEMQKGDQNE 120
 QIAAHVISEA SSNTTSVLQW A KGY T SN LVT ENGKO LTVKROGLY IYAQVTFCSN 180
 REASSQAFPI ASLQKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGO QSIHLGGVFE LQPGASVFN 240
 YDPSQVSHG TGFTSEGLLK L 261

Fig. 18A

MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LEAVYLHRRL DKIEDERNLH 60
EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKENS FEMQKGDQNP 120
QIAAHVISEA SSKTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKROGLYY IYAQVTFCSN 180
REASSQAPEI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LOPGASVFN 240
VTDPSQSHG GFTSFGLLK L 261

Fig. 18B

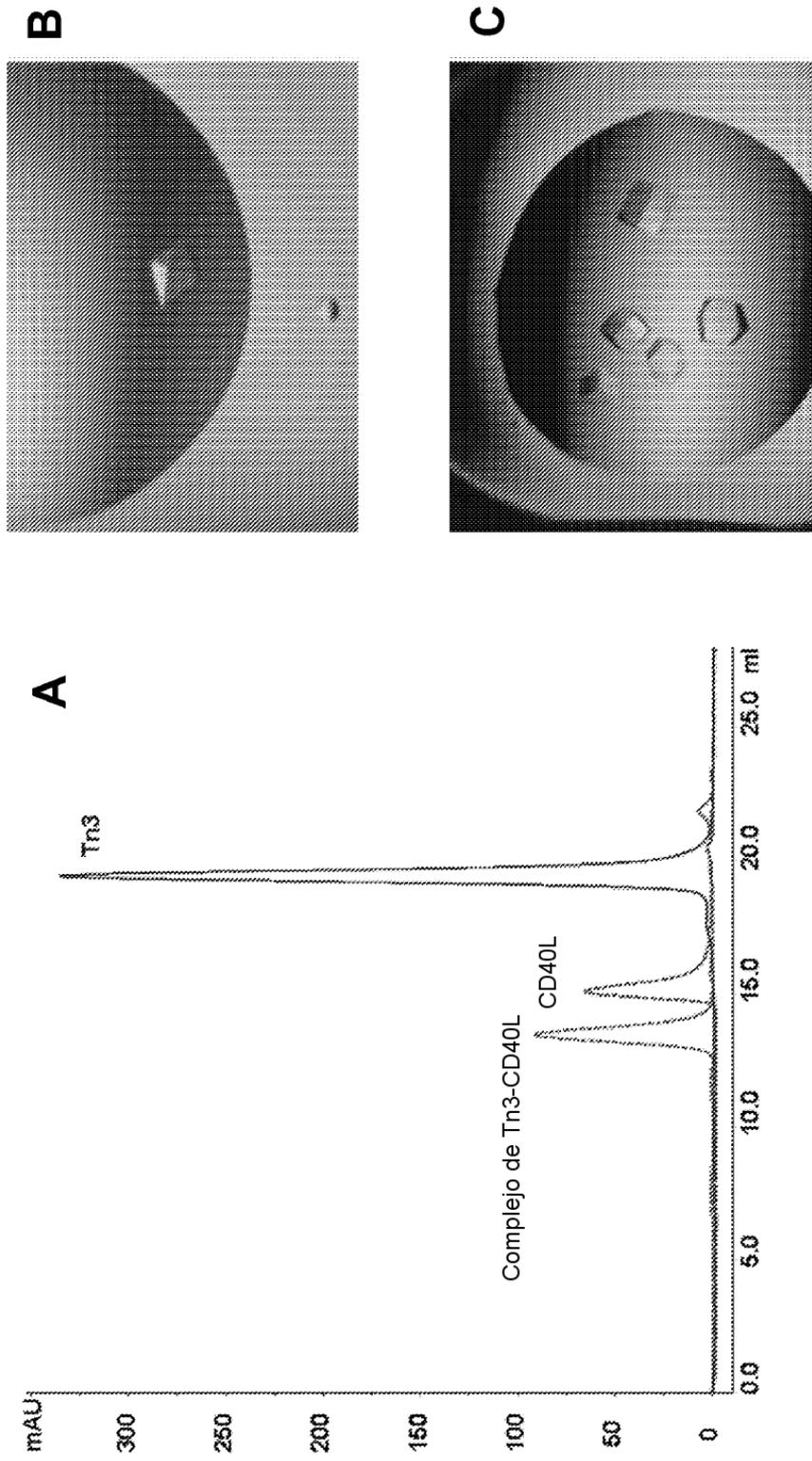


FIG. 19