

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 563**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2015 PCT/EP2015/061034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2015 E 15727573 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3145945**

54 Título: **Polipéptidos de unión específica novedosos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.05.2014 EP 14169488

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

07.05.2021

73 Titular/es:

PIERIS PHARMACEUTICALS GMBH (100.0%)

Lise-Meitner-Strasse 30

85354 Freising-Weihenstephan, DE

72 Inventor/es:

HINNER, MARLON;

WIEDENMANN, ALEXANDER y

ALLERSDORFER, ANDREA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 823 563 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

Polipéptidos de unión específica novedosos y usos de los mismos

5 **I. Antecedentes**

Las muteínas de diversas lipocalinas son una clase de agentes terapéuticos en rápida expansión. De hecho, pueden construirse muteínas de lipocalinas para que presenten una elevada afinidad y especificidad contra una diana que es diferente de un ligando natural de lipocalinas silvestres (por ejemplo, documentos WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029463, WO 03/029471 y WO 05/19256), tales como interleucina-17A o interleucina-23. El documento WO 2007/149032 A1 da a conocer miembros de unión, especialmente moléculas de anticuerpo, para interleucina 17 (IL-17). El documento WO 2012/156219 A1 da a conocer secuencias de aminoácidos que están dirigidas contra IL-17A, IL-17F y/o IL-17A/F. Se dan a conocer muteínas de lipocalinas modificadas por ingeniería genética por: Weiss *et al.*, Chemistry & Biology, volumen 7, tema 8, agosto de 2000, páginas 547-554; Skerra, Reviews in Molecular Biotechnology, vol. 74, n.º 4, 1 de junio de 2001, páginas 257-275; Schlehuber *et al.*, Expert Opinion on Biological Therapy, vol. 5, n.º 11, 1 de enero de 2005, páginas 1453-1462; Hohlbaum *et al.*, Expert Review of Clinical Immunology, vol. 3, n.º 4, 1 de enero de 2007, páginas 491-501; Skerra, Current Opinion in Molecular Therapeutics, vol. 9, n.º 4, 1 de agosto de 2007, páginas 336-344; y Skerra, FEBS Journal, vol. 275, n.º 11, 24 de junio de 2008, páginas 2677-2683.

20 **A. Interleucina-17A**

La interleucina-17A (IL-17A, sinónimo con IL-17) es una citocina producida a partir del linaje Th17 de células T. La IL-17 se designó originalmente "antígeno 8 asociado a CTL" (CTLA-8) (Rouvier *et al.*, J. Immunol, 150 5445-5556 (1993); Yao *et al.*, Immunity, 3: 811-821 (1995)). El equivalente humano de CTLA-8 se clonó luego y se designó "IL-17" (Yao *et al.*, J. Immunol, 155(12): 5483-5486 (1995); Fossiez *et al.*, J. Exp. Med., 183(6): 2593-2603 (1996)).

La IL-17A humana (CTLA-8, denominada además como IL-17, Swiss Prot Q16552) es una glicoproteína con un Mr de 17.000 Daltons (Spriggs *et al.*, J. Clin. Immunol, 17: 366-369 (1997)). La IL-17A puede existir o bien como un homodímero IL-17 A/A o bien como un heterodímero complejo con el homólogo IL-17F para formar IL-17 A/F heterodimérica. La IL-17F (IL-24, ML-1) comparte una identidad de aminoácidos del 55% con IL-17A. Las IL-17A e IL-17F también comparten el mismo receptor (IL-17RA), que se expresa en una amplia variedad de células incluyendo células endoteliales vasculares, células T periféricas, células B, fibroblastos, células pulmonares, células mielomonocíticas y células estromales de la médula ósea (Kolls *et al.*, Immunity, 21 : 467-476 (2004); Kawaguchi *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol, 114(6): 1267-1273 (2004); Moseley *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev., 14(2): 155-174 (2003)). Se han identificado homólogos de IL-17 adicionales (IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17E). Estos otros miembros de la familia comparten menos del 30% de identidad de aminoácidos con IL-17A (Kolls *et al.*, 2004).

La IL-17A se expresa principalmente por células Th17 y está presente a niveles elevados en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) y ha demostrado estar implicada en el desarrollo temprano de AR. La IL-17A se sobreexpresa también en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple (EM). Además, la IL-17 es un inductor de TNF- α e IL-1, siendo esta última principalmente responsable de la erosión ósea y las muy dolorosas consecuencias para los pacientes afectados (Lubberts E. (2008) Cytokine, 41, págs. 84-91). Además, la producción inapropiada o excesiva de IL-17A está asociada con la patología de otras diversas enfermedades y trastornos, tales como osteoartritis, aflojamiento de implantes óseos, rechazo agudo de trasplantes (Antonysamy *et al.*, (1999) J. Immunol, 162, págs. 577-584; van Kooten *et al.* (1998) J. Am. Soc. Nephrol., 9, págs. 1526-1534), septicemia, choque séptico o endotóxico, alergias, asma (Molet *et al.*, (2001) J. Allergy Clin. Immunol., 108, págs. 430-438), pérdida ósea, psoriasis (Teunissen *et al.* (1998) J. Invest. Dermatol, 111, págs. 645-649), isquemia, esclerosis sistémica (Kurasawa *et al.*, (2000) Arthritis Rheum., 43, págs. 2455-2463), accidente cerebrovascular y otros trastornos inflamatorios.

Aunque se han descrito una variedad de inhibidores de IL-17A, desde el descubrimiento de esta citocina proinflamatoria crítica, los enfoques actuales no son óptimos, tales como la necesidad de sistemas de producción de células de mamíferos complejos, una dependencia de la estabilidad de enlaces disulfuro, la tendencia a la agregación de algunos fragmentos de anticuerpos, limitada solubilidad y por último, pero no menos importante, pueden provocar respuestas inmunitarias no deseadas incluso cuando se humanizan. Sigue existiendo la necesidad, en consecuencia, de desarrollar proteínas tales como muteínas de lipocalinas con afinidad de unión por IL-17A.

55 **B. Interleucina-23**

La interleucina-23 (también conocida como IL-23) es una citocina heterodimérica compuesta por dos subunidades, es decir p19 y p40 (B. Oppmann *et al.*, Immunity 13, 715 (2000)). La subunidad p19 (Swiss Prot Q9NPF7, en el presente documento denominada indistintamente "IL-23p19") está estructuralmente relacionada con la IL-6, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y la subunidad p35 de IL-12. La IL-23 media en la señalización mediante su unión a un receptor heterodimérico, compuesto por IL-23R e IL-12beta1. La subunidad IL-12beta1 se comparte por el receptor de IL-12, que está compuesto por IL-12beta1 e IL-12beta2. Se han descrito recientemente ratones p19 transgénicos que presentan una profunda inflamación sistémica y neutrofilia (M. T. Wiekowski *et al.*, J Immunol 166,

7563 (2001)).

Se ha notificado que la IL-23 humana promueve la proliferación de células T, en particular células T de memoria y puede contribuir a la diferenciación y/o el mantenimiento de células Th 17 (D.M. Frucht, Sci STKE 8 de enero de 2002; 2002(114):PE1).

Aunque se han descrito una variedad de inhibidores selectivos de IL-23 (por medio de unión a la subunidad p19), desde el descubrimiento de esta citocina heterodimérica crítica, estas estrategias actuales aún tienen varios inconvenientes serios, tales como la necesidad de sistemas de producción de células de mamíferos complejos, una dependencia de la estabilidad de enlaces disulfuro, la tendencia a la agregación de algunos fragmentos de anticuerpos, limitada solubilidad y por último pero no menos importante, pueden provocar respuestas inmunitarias no deseadas incluso cuando se humanizan. Por tanto, existe una necesidad no satisfecha de desarrollar proteínas tales como muteínas de lipocalinas con afinidad de unión por IL-23.

II. Definiciones

La siguiente lista define términos, frases y abreviaturas usadas a lo largo de la presente memoria descriptiva. Todos los términos enumerados y definidos en el presente documentos están destinados a abarcar todas las formas gramaticales.

Tal como se usa en el presente documento, "IL-17A" (incluyendo IL-17 A/A así como IL-17A en complejo con IL-17F, también denominado IL-17 A/F) significa una proteína de longitud completa definida mediante Swiss Prot Q16552, un fragmento de la misma o una variante de la misma.

Tal como se usa en el presente documento, "IL-23p19" significa una proteína de longitud completa definida mediante Swiss Prot Q9NPF7, un fragmento de la misma o una variante de la misma.

Tal como se usa en el presente documento, "afinidad detectable" significa la capacidad de unirse a una diana seleccionada con una constante de afinidad de generalmente al menos aproximadamente 10^{-5} M. Menores afinidades generalmente ya no son medibles con métodos comunes tales como ELISA y, por tanto, son de importancia secundaria. Por ejemplo, las afinidades de unión de muteínas de lipocalinas según la divulgación pueden en algunos ejemplos ser de una K_D por debajo de 800 nM, en algunos ejemplos ser de una K_D por debajo de 30 nM y en algunas realizaciones de aproximadamente 50 picomolar (pM) o menores.

Tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" de una proteína de la divulgación (por ejemplo, una muteína de una lipocalina) o una proteína de fusión de la misma a una diana seleccionada (en el presente caso, IL-17A o IL-23p19), puede medirse (y de ese modo pueden determinarse los valores de K_D de un complejo de muteína-ligando) mediante una multitud de métodos conocidos para los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, titulación por fluorescencia, ELISA de competición, métodos calorimétricos, tales como calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y resonancia de plasmones superficiales (BIAcore). Tales métodos están bien establecidos en la técnica y también se detallan ejemplos de los mismos más adelante.

Se indica también que la formación del complejo entre el ligante respectivo y su ligando se ve influida por muchos factores diferentes tales como las concentraciones de las respectivas parejas de unión, la presencia de competidores, el pH y la fuerza iónica del sistema de tampón usado, y el método experimental usado para la determinación de la constante de disociación K_D (por ejemplo titulación por fluorescencia, ELISA de competición o resonancia de plasmones superficiales, para nombrar algunos) o incluso el algoritmo matemático que se usa para la evaluación de los datos experimentales.

Por tanto, también queda claro para el experto que los valores de K_D (constante de disociación del complejo formado entre el ligante respectivo y su diana/ligando) pueden variar dentro de un cierto intervalo experimental, dependiendo del método y la configuración experimental que se usa para determinar la afinidad de una muteína de lipocalina particular por un ligando dado. Esto significa que puede haber una ligera desviación en los valores de K_D medidos o un intervalo de tolerancia dependiendo, por ejemplo, de si el valor de K_D se determinó por resonancia de plasmones superficiales (BIAcore), por ELISA de competición o por "ELISA directo".

Tal como se usa en el presente documento, una "muteína", una entidad "mutada" (ya sea proteína o ácido nucleico) o "mutante" se refiere al intercambio, la delección o inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, en comparación con el armazón de "referencia" de ácido nucleico o proteína que se produce de manera natural (silvestre).

El término "fragmento" tal como se usa en el presente documento en conexión con las muteínas de la divulgación se refiere a proteínas o péptidos derivados de lipocalina lagrimal humana madura, de longitud completa, que están acortados de manera N-terminal y/o C-terminal, es decir que carecen de al menos uno de los aminoácidos N-terminal y/o C-terminal. Tales fragmentos pueden incluir al menos 10, más tal como 20 o 30 o más aminoácidos consecutivos de la secuencia primaria de la lipocalina madura y son habitualmente detectables en un inmunoensayo de la lipocalina madura. Dicho término también incluye fragmentos de una muteína y variantes tal como se describe en el presente

documento. Las muteínas de lipocalina de la presente divulgación, fragmentos o variantes de las mismas conservan preferiblemente la función de unión a IL-17A y/o IL23p19 tal como se describe en el presente documento.

5 En general, el término "fragmento", tal como se usa en el presente documento con respecto al correspondiente ligando proteico IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) o IL-23p19 de una muteína de lipocalina de la divulgación o de la combinación según la divulgación o de una proteína de fusión descrita en el presente documento, se refiere a ligandos proteicos o peptídicos acortados de manera N-terminal y/o C-terminal, que retienen la capacidad del ligando de longitud completa de ser reconocido por y/o unirse a una muteína según la descripción.

10 El término "mutagénesis" tal como se usa en el presente documento significa que las condiciones experimentales se eligen de modo que el aminoácido que se produce de manera natural en una posición de secuencia dada de la lipocalina madura puede estar sustituida por al menos un aminoácido que no está presente en esta posición específica en la respectiva secuencia de polipéptido natural. El término "mutagénesis" también incluye la modificación (adicional) de la longitud de segmentos de secuencia mediante delección o inserción de uno o más aminoácidos. Por tanto, está dentro del alcance de la descripción que, por ejemplo, un aminoácido en una posición de secuencia elegida se reemplace por un tramo de tres mutaciones aleatorias, conduciendo a una inserción de dos residuos de aminoácido en comparación con la longitud del respectivo segmento de la proteína silvestre. Una inserción o delección de este tipo puede introducirse independientemente entre sí en cualquiera de los segmentos peptídicos que pueden someterse a mutagénesis en la divulgación. En un ejemplo de la divulgación, puede introducirse una inserción de varias mutaciones en el bucle AB del armazón de lipocalina elegido (véase la solicitud internacional de patente WO 2005/019256).

15 El término "mutagénesis aleatoria" significa que ningún aminoácido individual predeterminado (mutación) está presente en una cierta posición de secuencia sino que al menos dos aminoácidos pueden estar incorporados con una cierta probabilidad en una posición de secuencia predefinida durante la mutagénesis.

25 "Identidad" es una propiedad de las secuencias que mide su similitud o relación. El término "identidad de secuencia" o "identidad" tal como se usa en la presente divulgación significa el porcentaje de residuos idénticos por parejas, tras la alineación (homóloga) de una secuencia de un polipéptido de la divulgación con una secuencia en cuestión, con respecto al número de residuos en la más larga de estas dos secuencias. La identidad se mide dividiendo el número de residuos idénticos entre el número total de residuos y multiplicando el producto por 100.

30 El término "homología" se usa en el presente documento en su significado habitual e incluye aminoácidos idénticos así como aminoácidos que se considera que son sustituciones conservativas (por ejemplo, intercambio de un residuo glutamato por un residuo aspartato) en posiciones equivalentes en la secuencia lineal de aminoácidos de un polipéptido de la divulgación (por ejemplo, cualquier muteína de lipocalina de la divulgación).

35 El porcentaje de homología de secuencia o identidad de secuencia puede determinarse, por ejemplo, en el presente documento usando el programa BLASTP, versión Blastp 2.2.5 (16 de noviembre de 2002; véase Altschul, S. F. *et al.* (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). En esta realización, el porcentaje de homología se basa en la alineación de las secuencias polipeptídicas completas (matriz: BLOSUM 62; costes de hueco: 11,1; valor de corte fijado en 10^{-3}) incluyendo las secuencias de propéptidos, preferiblemente usando el armazón proteico silvestre como referencia en una comparación por parejas. Se calcula como el porcentaje de números de "positivos" (aminoácidos homólogos) indicado como resultado en la salida del programa BLASTP dividido entre el número total de aminoácidos seleccionados por el programa para la alineación.

40 Específicamente, con el fin de determinar si un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de una lipocalina (muteína) diferente de la lipocalina silvestre corresponde a una cierta posición en la secuencia de aminoácidos de una lipocalina silvestre, un experto en la técnica puede usar medios y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo alineaciones, o bien manualmente o bien usando programas informáticos tales como BLAST 2.0, que significa Basic Local Alignment Search Tool o ClustalW o cualquier otro programa que sea adecuado para generar alineaciones de secuencias. Por consiguiente, una lipocalina silvestre puede servir como "secuencia sujeto" o "secuencia de referencia", mientras que la secuencia de aminoácidos de una lipocalina diferente de la lipocalina silvestre descrita en el presente documento sirve como "secuencia de consulta". Los términos "secuencia de referencia" y "secuencia silvestre" se usan indistintamente en el presente documento.

45 Los "huecos" son espacios en una alineación que son el resultado de adiciones o delecciones de aminoácidos. Así, dos copias de exactamente la misma secuencia tienen el 100% de identidad, pero secuencias que están menos altamente conservadas y tienen delecciones, adiciones o reemplazos, pueden tener un menor grado de identidad. Los expertos en la técnica reconocerán que están disponibles varios programas informáticos para determinar la identidad de secuencia usando parámetros convencionales, por ejemplo Blast (Altschul, *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast2 (Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410) y Smith-Waterman (Smith, *et al.* (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197).

50 El término "variante" tal como se usa en la presente divulgación se refiere a derivados de una proteína o péptido que incluyen modificaciones de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo mediante sustitución, delección, inserción o modificación química. Tales modificaciones hechas en algunos ejemplos, no reducen la funcionalidad de la proteína o

péptido. Tales variantes incluyen proteínas, en las que uno o más aminoácidos se han reemplazados por sus respectivos D-estereoisómeros o por aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural, tales como por ejemplo ornitina, hidroxiprolina, citrulina, homoserina, hidroxilisina, norvalina. Sin embargo, tales sustituciones pueden ser también conservativas, es decir un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido químicamente similar. Ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre miembros de los siguientes grupos: 1) alanina, serina y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina y valina; y 6) fenilalanina, tirosina y triptofano. El término "variante", tal como se usa en el presente documento con respecto al correspondiente ligando proteico IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) o IL-23p19 de una muteína de lipocalina de la divulgación o de la combinación según la divulgación o de una proteína de fusión descrita en el presente documento, se refiere a una proteína IL-17 o fragmento de la misma o proteína IL-23 o fragmento de la misma, respectivamente, que tiene una o más, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína IL-17A o IL-23p19 silvestre, respectivamente, tal como una proteína de referencia IL-17A o IL-23p19 depositada en SwissProt tal como se describe en el presente documento. Una variante de IL-17A o IL-23p19, respectivamente, tiene preferiblemente una identidad de aminoácidos de al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95% con una proteína IL-17A o IL-23p19 silvestre, respectivamente, tal como una proteína de referencia IL-17A o IL-23p19 depositada en SwissProt tal como se describe en el presente documento.

Por una lipocalina de "secuencia nativa" quiere decirse una lipocalina que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido derivado de la naturaleza. Así, una lipocalina de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de la respectiva lipocalina que se produce de manera natural a partir de cualquier organismo, en particular un mamífero. Tal polipéptido de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o de síntesis. El término polipéptido de "secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas que se produce de manera natural de la lipocalina, formas variantes que se produce de manera natural tales como formas cortadas y empalmadas alternativamente y variantes alélicas que se produce de manera natural de la lipocalina. Una "variante" de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o al menos el 85% de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos están añadidos o delecionados en los extremos N- o C-terminales del polipéptido. Generalmente, una variante tiene al menos aproximadamente el 70%, incluyendo al menos aproximadamente el 80%, tal como al menos aproximadamente el 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, incluyendo al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de aminoácidos o al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Como ejemplo ilustrativo, los primeros 4 residuos de aminoácidos N-terminales (HHLA) y los 2 últimos residuos de aminoácidos C-terminales (Ser, Asp) pueden deleccionarse, por ejemplo, en una muteína de lipocalina lagrimal (Tlc) de la divulgación sin afectar a la función biológica de la proteína, por ejemplo SEQ ID NO: 1.

El término "posición" cuando se usa según la divulgación significa la posición de o bien un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento o bien la posición de un nucleótido dentro de una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento. Para comprender el término "corresponde" o "que corresponde" tal como se usa en el presente documento en el contexto de las posiciones de la secuencia de aminoácidos de una o más muteínas de lipocalinas, una posición correspondiente no está determinada solamente por el número de los nucleótidos/aminoácidos precedentes. Por consiguiente, la posición de un aminoácido dado según la divulgación que puede estar sustituido puede variar debido a deleción o adición de aminoácidos en cualquier otra parte en una lipocalina (mutante o silvestre). De manera similar, la posición de un nucleótido dado según la presente divulgación que puede estar sustituido puede variar debido a deleciones o nucleótidos adicionales en cualquier otra parte en una región no traducida en 5' (UTR) de una muteína o lipocalina silvestre, incluyendo el promotor y/o cualquier otra secuencia reguladora o gen (incluyendo exones e intrones).

Así, para una correspondiente posición según la divulgación, es preferible que se entienda que las posiciones de nucleótidos/aminoácidos pueden diferir en el número indicado respecto a nucleótidos/aminoácidos vecinos similares, pero dichos nucleótidos/aminoácidos vecinos, que pueden intercambiarse, deleccionarse o añadirse, también están comprendidos por la una o más posiciones correspondientes.

Además, para una correspondiente posición en una muteína de lipocalina basada en un armazón de referencia según la divulgación, es preferible que se entienda que las posiciones de los nucleótidos/aminoácidos son estructuralmente correspondientes a las posiciones en cualquier otra parte en una lipocalina (mutante o silvestre), incluso si pueden diferir en el número indicado, tal como apreciará el experto a la luz del patrón de plegado global altamente conservado entre las lipocalinas.

El término "albúmina" incluye todas las albúminas de mamífero tales como albúmina sérica humana o albúmina sérica bovina o albúmina sérica de rata.

El término "molécula orgánica" o "molécula orgánica pequeña" tal como se usa en el presente documento para la diana no natural indica una molécula orgánica que comprende al menos dos átomos de carbono, pero preferiblemente no más de 7 o 12 enlaces de carbono giratorios, que tiene un peso molecular en el intervalo de entre 100 y 2000 Dalton,

preferiblemente entre 100 y 1000 Dalton, y que incluye opcionalmente uno o dos átomos de metal.

La palabra “detectar”, “detección”, “detectable” o “que detecta” tal como se usa en el presente documento se entiende tanto a un nivel cuantitativo como cualitativo, así como una combinación de los mismos. Así, incluye mediciones cuantitativas, semicuantitativas y cualitativas de una molécula de interés.

Un “sujeto” es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano. El término “mamífero” se usa en el presente documento para referirse a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo sin limitación, humanos, animales domésticos o de granja, y animales de zoológico, deportes o mascotas, tales como ovejas, perros, caballos, gatos, vacas, ratas, cerdos, primates tales como monos cynomolgus, etc. por nombrar sólo unos pocos ejemplos ilustrativos. Preferiblemente, el mamífero en el presente documento es humano.

Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones.

Una “muestra” se define como una muestra biológica tomada de cualquier sujeto. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, heces, semen o tejido.

Un “polipéptido de fusión” tal como se describe en el presente documento comprende al menos dos subunidades, en el que una subunidad tiene especificidad de unión por IL-17A o tiene especificidad de unión por IL-23p19. Dentro del polipéptido de fusión, estas subunidades pueden estar unidas por una unión covalente o no covalente. Preferiblemente, el polipéptido de fusión es una fusión traduccional entre las dos o más subunidades. La fusión traduccional puede generarse modificando por ingeniería genética la secuencia codificante para una subunidad en marco con la secuencia codificante de una subunidad adicional. Ambas subunidades pueden estar intercaladas por una secuencia de nucleótidos que codifica para un ligador. Sin embargo, las subunidades de un polipéptido de fusión de la presente divulgación pueden también estar unidas mediante un ligador químico.

Un “ligador” que puede estar comprendido por un polipéptido de fusión de la presente divulgación una dos o más subunidades de un polipéptido de fusión tal como se describe en el presente documento. La unión puede ser covalente o no covalente. Una unión covalente preferida es mediante un enlace peptídico, tal como un enlace peptídico entre aminoácidos. Por consiguiente, en una realización preferida, dicho ligador comprende uno o más aminoácidos, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos. Se describen ligadores preferidos en el presente documento. Otros ligadores preferidos son ligadores químicos.

III. Descripciones de las figuras

Figura 1: proporciona una medición típica de la constante de la velocidad de asociación y de la constante de la velocidad de disociación mediante resonancia de plasmones superficiales para la interacción de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 con IL-17A humana. Se inmovilizó IL-17A sobre un chip sensor usando química de aminas convencional, y se empleó la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 como analito soluble que se hizo fluir a través de la superficie del chip. La constante de disociación (K_D) resultante es 0,8 nM.

Figura 2: proporciona una medición típica de la constante de la velocidad de asociación y de la constante de la velocidad de disociación mediante resonancia de plasmones superficiales para la interacción de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 con IL-17A/F humana. Se capturó SEQ ID NO: 1 biotinilada sobre un chip sensor usando un kit experimental especializado y se empleó IL-17 A/F humana como analito soluble que se hizo fluir a través de la superficie del chip. La constante de disociación (K_D) resultante es 100 pM.

Figura 3: demuestra que la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 es capaz de bloquear la interacción entre hIL-17A y su receptor hIL-17RA con una CI50 de 75 pM. Se preincubó hIL-17A biotinilada con concentraciones variables de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 y se cuantificó hIL-17A no neutralizada sobre una placa de ELISA con hIL-17RA soluble inmovilizado. La SEQ ID NO: 41 de control negativo no tuvo efecto competitivo. Los datos se ajustaron con un modelo de unión de un solo sitio.

Figura 4: muestra el perfil de reactividad cruzada de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 tal como se mide en un formato de ELISA de competición. La reactividad cruzada completa con IL-17A de mono cynomolgus e IL-17A de mono tití es evidente a partir de los valores de CI50 casi idénticos en comparación con hIL-17A. Los datos se ajustaron con un modelo de unión de un solo sitio.

Figura 5: ilustra que la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 es altamente eficaz en el bloqueo de la unión de hIL-17A a su receptor hIL-17RA en un ensayo basado en células. El ensayo se basa en la secreción inducida por hIL-17A de G-CSF en células U87-MG. Las células se incubaron con una concentración fija de hIL-17A y se titularon con la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 o, para comparación, con anticuerpo 1 de referencia (cadena pesada SEQ ID NO: 53, cadena ligera SEQ ID NO: 54), con anticuerpo 2 de referencia (cadena pesada SEQ ID NO: 55, cadena ligera SEQ ID NO: 56) y SEQ ID NO: 2 como control negativo. Se representa gráficamente la concentración de G-CSF en unidades arbitrarias tal como se mide mediante MSD (Meso Scale Discovery®, a continuación en el presente

documento "MSD") frente a la concentración de muteínas de lipocalinas o moléculas de anticuerpo. El valor de CI50 promedio resultante para la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 fue 0,13 nM (0,17 nM en el primer experimento, 0,10 nM en el experimento de repetición), que fue significativamente más potente que el anticuerpo de referencia 1, que presentó una CI50 promedio = 2,33 (2,65/2,01) nM, y en un intervalo similar en comparación con el anticuerpo de referencia 2, con una CI50 promedio = 0,12 (0,14/0,10) nM. El control negativo SEQ ID NO: 2 no tuvo efecto sobre la producción de G-CSF inducida por IL-17A de las células. La unión de SEQ ID NO: 1 o de moléculas de anticuerpos de referencia a IL-17A bloquea la unión de IL-17A a IL-17RA de la superficie celular y, así, impide la inducción de la secreción de G-CSF. Los datos se ajustaron con un modelo de unión de un solo sitio, asumiendo iguales mesetas de concentración de G-CSF para todas las moléculas.

Figura 6: proporciona una medición típica de la constante de la velocidad de asociación y de la constante de la velocidad de disociación mediante resonancia de plasmones superficiales para la interacción de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 con IL-23 humana. La constante de disociación promedio determinada en tres experimentos replicados ascendió a $K_D = 0,35 \pm 0,20$ nM.

Figura 7: proporciona una medición típica de la constante de la velocidad de asociación y de la constante de la velocidad de disociación mediante resonancia de plasmones superficiales para la interacción de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 con IL-23 humana. Se capturó SEQ ID NO: 2 biotinilada sobre un chip sensor usando un kit experimental especializado y se empleó IL-23 como analito soluble que se hizo fluir a través de la superficie del chip. La constante de disociación (K_D) resultante es 2,9 nM. Obsérvese que tuvieron que emplearse concentraciones elevadas, no fisiológicas, de NaCl para facilitar la realización del ensayo. El resultado es, en consecuencia, no representativo de la afinidad de la SEQ ID NO: 2 por IL-23 en condiciones fisiológicas. La utilidad del ensayo radica en su capacidad para permitir comparaciones de la afinidad de SEQ ID NO: 2 y proteínas de fusión que contienen esta muteína (véase el ejemplo 11 y la tabla 1).

Figura 8: demuestra que la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 es capaz de bloquear la interacción entre hIL-23 y su receptor hIL-23R con una CI50 de 0,54 nM. Se preincubó hIL-23 biotinilada con concentraciones variables de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 y se cuantificó hIL-23 no neutralizada sobre una placa de ELISA con hIL-23R soluble inmovilizado. El control negativo SEQ ID NO: 43 no tuvo efecto competitivo. Los datos se ajustaron con un modelo de un solo sitio de unión.

Figura 9: muestra el perfil de reactividad cruzada y especificidad de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 tal como se mide en un formato de ELISA de competición. La muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 es completamente reactiva de manera cruzada con IL-23 humana y de ratón y presenta una afinidad algo reducida hacia IL-23 de mono cynomolgus y mono tití. Los datos se ajustaron con un modelo de unión de un solo sitio.

Figura 10: demuestra que la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 es capaz de bloquear la actividad biológica de hIL-23 en un ensayo de proliferación basado en células. En el ensayo, se preincubaron SEQ ID NO: 2 y un control negativo de isotipo de IgG y dos anticuerpos de referencia (referencia 3: cadena pesada, SEQ ID NO: 57 y, cadena ligera, SEQ ID NO: 58; referencia 4: cadena pesada, SEQ ID NO: 59 y cadena ligera, SEQ ID NO: 60) con hIL-23 y posteriormente se añadieron a células Ba/F3 transfectadas con hIL-23R y hIL-12R β 1. Las células Ba/F3 transfectadas proliferaron en respuesta a IL-23 humana. El experimento muestra que esta actividad biológica se bloquea por SEQ ID NO: 2 y los anticuerpos de referencia 3 y 4 con valores de CE50 de 1,2 nM (1,7/0,7), 3,0 nM (3,1/2,9), 1,2 nM (0,8/1,5), respectivamente. El control negativo no tuvo efecto sobre la proliferación celular. Los datos se ajustaron con un modelo de respuesta a la dosis sigmoideo.

Figura 11: proporciona una visión general gráfica de los constructos SEQ ID NO: 1-13 caracterizados en la tabla 1. SEQ ID NO: 1 (abreviada en la figura 11 como "1") corresponde a la muteína de lipocalina que se une a IL-17A. SEQ ID NO: 2 (abreviada como "2") corresponde a una muteína de lipocalina que se une a IL-23. SEQ ID NO: 14 (abreviada como "14") corresponde al dominio de unión a albúmina de la proteína G de estreptococos. SEQ ID NO: 15 (abreviada como "15") es una versión, desimmunizada, modificada por ingeniería genética de la SEQ ID NO: 14. SEQ ID NO: 16 (abreviada como "16") corresponde a la parte Fc de un anticuerpo IgG1 humano.

Figura 12: demuestra en un experimento a modo de ejemplo que una proteína de fusión multiespecífica basada en las muteínas de lipocalinas descritas en el presente documento es capaz de unirse simultáneamente a IL-17A, IL-23 y albúmina sérica humana (HSA), sin interferencia de las otras dianas respectivas a las que están unidas. SEQ ID NO: 9 es una proteína de fusión heterodimérica de la muteína de lipocalina SEQ ID NO: 1 que se une a IL-17A, la muteína de lipocalina SEQ ID NO: 2 que se une a IL-23 y un péptido de unión a albúmina sérica humana derivado del dominio de unión a albúmina de la proteína G de estreptococos. En el experimento de resonancia de plasmones superficiales mostrado en la figura 12, se capturó SEQ ID NO: 9 biotinilada sobre un chip sensor. Para demostrar la unión simultánea, se aplicaron consecutivamente diluciones de hIL-17A/F, hIL-23 y HSA en tampón a la superficie del chip preparada. Por comparación, también se llevó a cabo la aplicación de hIL-17A/F, hIL-23 y HSA a la SEQ ID NO: 9 inmovilizada empleando la diana individual para obtener los máximos niveles de unión obtenibles por la unión a una sola diana. La figura 12 muestra la curva de unión medida y una curva de unión teórica que refleja la respuesta esperada para la unión completa a las tres dianas. Esta última se obtuvo reuniendo la respuesta experimental de SEQ ID NO: 9 a las dianas individuales. Las curvas medida y teórica son casi idénticas, siendo la diferencia presentada

atribuible a la disociación de las dianas en la curva experimental. Los datos muestran que SEQ ID NO: 9 es capaz de unirse simultáneamente a todas las dianas sin una pérdida de intensidad de señal o un cambio en la cinética en comparación con la unión a una única diana solamente.

5 Figura 13: proporciona mediciones típicas de la constante de velocidad de asociación y la constante de velocidad de disociación mediante resonancia de plasmones superficiales para las muteínas de lipocalinas SEQ ID NO: 45 (figura 13A) y SEQ ID NO: 46 (figura 13B) que se unen a IL-23 humana. Las constantes de disociación (K_D) resultantes son 0,1 nM (SEQ ID NO: 45) y 0,6 nM (SEQ ID NO: 46), respectivamente.

10 Figura 14: demuestra que las muteínas de lipocalina SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 son capaces de bloquear la interacción entre hIL-23 y su receptor hIL-23R con una CI50 de 0,1 nM (SEQ ID NO: 45) y 1,1 nM (SEQ ID NO: 46), respectivamente. Se preincubó hIL-23 biotinilada con concentraciones variables de dichas muteínas de lipocalina y se cuantificó hIL-23 no neutralizada sobre una placa de ELISA con hIL-23R soluble inmovilizado. Los datos se ajustaron con un modelo de unión de un solo sitio.

15 Figura 15: demuestra que las muteínas de lipocalinas de SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 son capaces de bloquear la actividad biológica de hIL-23 en un ensayo de proliferación basado en células. En el ensayo, se preincubaron SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 y el control negativo SEQ ID NO: 43 con hIL-23 y posteriormente se añadieron a células Ba/F3 transfectadas con hIL-23R y hIL-12R β 1. Las células Ba/F3 transfectadas proliferaron en respuesta a IL-23 humana. El experimento muestra que esta actividad biológica se bloquea por SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 con valores de CI50 de 3,7 nM y 5,4 nM, respectivamente. El control negativo SEQ ID NO: 43 no tuvo efecto sobre la proliferación celular. Los datos se ajustaron con un modelo de respuesta a la dosis sigmoideo.

20 Figura 16: proporciona un experimento representativo en el que se determinó la especificidad de SEQ ID NO: 63 y 62 y la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 hacia la diana IL-17A. Se capturó IL-17A biotinilada sobre una placa de microtitulación y se titularon las moléculas de prueba. Las moléculas de prueba unidas se detectaron mediante un anticuerpo específico anti-TLc humano marcado con HRP tal como se describe en el ejemplo 16. Los datos se ajustaron con un modelo de unión 1:1 con el valor de CE50 y la señal máxima como parámetros libres, y una pendiente que se fijó a la unidad.

30 Figura 17: proporciona un experimento representativo en el que se determinó la especificidad de SEQ ID NO: 64 y 62 y la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 hacia la diana IL-23. Se capturó IL-23 biotinilada sobre una placa de microtitulación y se titularon las moléculas de prueba. Las moléculas de prueba unidas se detectaron mediante un anticuerpo específico anti-NGAL humano marcado con HRP tal como se describe en el ejemplo 17. Los datos se ajustaron con un modelo de unión 1:1 con el valor de CE50 y la señal máxima como parámetros libres, y una pendiente que se fijó a la unidad.

35 Figura 18: proporciona un experimento representativo en el que se determinó la especificidad del polipéptido de fusión de SEQ ID NO: 63 y 62 y el polipéptido de fusión de SEQ ID NO: 64 y 62 así como del anticuerpo de SEQ ID NO: 61 y 62 hacia la diana TNF- α . Se recubrió una placa de microtitulación con TNF- α y se titularon las moléculas de prueba. Las moléculas de prueba unidas se detectaron mediante un anticuerpo específico para Fc anti-IgG humana marcado con HRP tal como se describe en el ejemplo 18. Los datos se ajustaron con un modelo de unión 1:1 con el valor de CE50 y la señal máxima como parámetros libres, y una pendiente que se fijó a la unidad.

45 Figura 19: proporciona un experimento representativo en el que se determinó la capacidad del polipéptido de fusión de SEQ ID No: 63 y 62 y del polipéptido de fusión de SEQ ID NO: 64 y 62 para unirse simultáneamente a ambas dianas, TNF- α e IL-17A, TNF- α e IL-23, respectivamente. Se recubrió una placa de microtitulación con TNF- α recombinante, seguido por una titulación de las fusiones de polipéptidos. Posteriormente, se añadió una concentración constante de o bien IL-17A o bien IL-23 biotiniladas, que se detectaron mediante extravidina marcada con HRP tal como se describe en el ejemplo 19. Los datos se ajustaron con un modelo de unión 1:1 con el valor de CE50 y la señal máxima como parámetros libres, y una pendiente que se fijó a la unidad.

IV. Descripción detallada de la divulgación

55 La presente invención se refiere a una muteína de lipocalina lagrimal humana que tiene especificidad de unión para IL-17A, en la que la muteína se une a IL-17A con una KD de aproximadamente 1 nM o menos, en la que la muteína tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 y en la que la muteína comprende las siguientes mutaciones de residuos de aminoácido en posiciones de secuencia correspondientes a la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura (SEQ ID NO: 41): Arg 26 \rightarrow Phe; Glu 27 \rightarrow Trp; Phe 28 \rightarrow Cys; Pro 29 \rightarrow Ser; Glu 30 \rightarrow Gly; Met 31 \rightarrow Ile; Asn 32 \rightarrow His; Leu 33 \rightarrow Glu; Leu 56 \rightarrow Asp; Ser 58 \rightarrow Glu; Arg 60 \rightarrow Phe; Cys 61 \rightarrow Leu; Val 64 \rightarrow Phe; His 92 \rightarrow Arg; Cys101 \rightarrow Ser; Glu 104 \rightarrow Asp; Leu 105 \rightarrow Cys; His 106 \rightarrow Pro; delección de Lys 108; Arg 111 \rightarrow Pro; Lys 114 \rightarrow Trp; y Cys 153 \rightarrow Ser.

65 La presente invención también se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades, en la que una subunidad es la muteína de la invención y otra subunidad (a) tiene especificidad de unión por IL-23p19; (b) contiene un dominio de unión a albúmina (ABD) o un péptido de unión a albúmina; (c) es una parte Fc de un anticuerpo

humano; o (d) contiene una proteína de inhibición de TNF.

La presente divulgación contribuye al estado de la técnica con un polipéptido o proteína que tiene especificidad de unión por IL-17A y/o IL-23p19, en el que el polipéptido comprende una muteína de lipocalina que se une con al menos una afinidad detectable a IL-17A o IL-23p19.

En algunos ejemplos, el polipéptido es una muteína de lipocalina que es capaz de unirse a IL-17A con al menos una afinidad detectable. En algunos ejemplos, el polipéptido es una muteína de lipocalina que es capaz de unirse a IL-23p19 con al menos una afinidad detectable. La presente divulgación también se refiere al uso de ambos polipéptidos, para la unión de IL-17A e IL-23p19 en un sujeto.

En algunos aspectos, el polipéptido es una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades, en donde una subunidad tiene especificidad de unión por IL-17A y otra subunidad tiene especificidad de unión por IL-23p19. En algunas realizaciones adicionales, la proteína de fusión puede comprender además una subunidad, en donde la subunidad tiene especificidad de unión por IL-23p19 o IL-17A. En aún algunas realizaciones adicionales, la proteína de fusión puede comprender una subunidad específica para IL-17A, una subunidad específica para IL-23p19, y una subunidad que contiene un dominio de unión a albúmina bacteriano (ABD).

En algunos otros aspectos, un polipéptido de la divulgación puede ser también una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades específicas para IL-17A, o una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades específicas para IL-23p19.

En algunas realizaciones, la subunidad de la proteína de fusión que tiene especificidad de unión por IL-17A comprende una muteína de lipocalina específica para IL-17A de la invención. En algunas realizaciones, la subunidad de la proteína de fusión que tiene especificidad de unión por IL-23p19 comprende un anticuerpo que se une a IL-23p19. En algunas otras realizaciones, la subunidad de la proteína de fusión que tiene especificidad de unión por IL-23p19 comprende una muteína de lipocalina específica para IL-23p19 de la divulgación. En algunos ejemplos, la subunidad de la proteína de fusión que tiene especificidad de unión por IL-17A comprende un anticuerpo que se une a IL-17A.

Un polipéptido o proteína de la divulgación puede ser una muteína de una lipocalina, preferiblemente una lipocalina seleccionada del grupo que consiste en proteína de unión a retinol (RBP), proteína de unión a bilina (BBP), apolipoproteína D (APO D), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), lipocalina lagrimal (TLPC o Tlc), proteína relacionada con α 2-microglobulina (A2m), 24p3/uterocalina (24p3), proteína 1 de glándulas de von Ebners (VEGP 1), proteína 2 de glándulas de von Ebners (VEGP 2) y precursor de alérgeno mayor Can f1 (ALL-1).

Tal como se usa en el presente documento, una "lipocalina" se define como una proteína monomérica de aproximadamente 18-20 kDa en peso, que tiene una región estructural supersecundaria de hoja plegada en β cilíndrica que comprende una pluralidad de (preferiblemente ocho) hebras β conectadas por parejas mediante una pluralidad de (preferiblemente cuatro) bucles en un extremo para definir de este modo un bolsillo de unión. Es la diversidad de los bucles en el armazón de la lipocalina por lo demás rígido lo que da origen a una variedad de modos de unión diferentes entre los miembros de la familia de lipocalinas, cada uno capaz de acomodar dianas de diferente tamaño, forma y carácter químico (revisado por ejemplo en Flower, D.R. (1996), citado anteriormente; Flower, D.R. *et al.* (2000), citado anteriormente, o Skerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350). De hecho, la familia de proteínas lipocalinas han evolucionado de manera natural para unirse a un amplio espectro de ligandos, compartiendo niveles de conservación inusualmente bajos de la secuencia global (a menudo con identidades de secuencia de menos del 20%) reteniendo aún un patrón de plegado global altamente conservado. La correspondencia entre posiciones en diversas lipocalinas es bien conocida por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.250.297.

Tal como se indicó anteriormente, una lipocalina es un polipéptido definido por su estructura supersecundaria, concretamente una región estructural supersecundaria de hoja plegada en β cilíndrica que comprende ocho hebras β conectadas por parejas mediante cuatro bucles en un extremo para definir de ese modo un bolsillo de unión. La presente divulgación no está limitada a muteínas de lipocalina dadas a conocer específicamente en el presente documento. En este sentido, la descripción se refiere a una muteína de lipocalina que tiene una región estructural supersecundaria de hoja plegada en β cilíndrica que comprende ocho hebras β conectadas por parejas mediante cuatro bucles en un extremo para definir de ese modo un bolsillo de unión, en donde al menos un aminoácido de cada uno de al menos tres de dichos cuatro bucles se ha mutado y en donde dicha lipocalina es eficaz para unirse a IL-17A o IL-23p19 con afinidad detectable.

Una muteína de lipocalina dada a conocer en el presente documento es una muteína de lipocalina lagrimal humana (TLPC o Tlc), también denominada lipocalina-1, pre-albúmina lagrimal o proteína de glándulas de von Ebner. El término "lipocalina lagrimal humana" o "Tlc" o "lipocalina-1" tal como se usa en el presente documento se refiere a la lipocalina lagrimal humana madura con el número de registro de SWISS-PROT/UniProt Data Bank P31025 (isoforma 1). La secuencia de aminoácidos mostrada en el número de registro de SWISS-PROT/UniProt Data Bank P31025 puede usarse como "secuencia de referencia" preferida, más preferiblemente la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 41 se usa como secuencia de referencia.

La presente divulgación también abarca muteínas de Tlc tal como se definieron anteriormente, en las cuales los primeros cuatro residuos de aminoácidos N-terminales de la secuencia de la lipocalina lagrimal humana madura (His-His-Leu-Leu; posiciones 1-4) y/o los dos últimos residuos de aminoácidos C-terminales (Ser-Asp; posiciones 157-158) de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura (número de registro de SWISS-PROT Data Bank P31025) se han delecionado (SEQ ID NO: 2-5). Además, la presente divulgación abarca muteínas de Tlc tal como se definieron anteriormente, en las cuales se ha delecionado un residuo de aminoácido (Lys) del bucle GH correspondiente a la posición de secuencia 108 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 43). Otra posible mutación de la secuencia polipeptídica silvestre de la lipocalina lagrimal humana madura es cambiar la secuencia de aminoácidos en las posiciones de secuencia 5 a 7 (Ala Ser Asp) a Gly Gly Asp tal como se describe en la solicitud PCT WO 2005/019256.

Una muteína de Tlc según la divulgación puede incluir adicionalmente una sustitución de aminoácidos Arg 111 → Pro. Una muteína de Tlc según la divulgación puede incluir también una sustitución Lys 114 → Trp. Puede comprender también una sustitución Cys 101 → Ser o Cys 101 → Thr. Una muteína de Tlc según la divulgación puede comprender también una sustitución Cys 153 → Ser.

Las modificaciones de la secuencia de aminoácidos incluyen mutagénesis dirigida de posiciones de aminoácidos únicas con el objeto de simplificar la subclonación del gen de lipocalina mutado o sus partes mediante la incorporación de sitios de escisión para ciertas enzimas de restricción. Además, estas mutaciones también pueden incorporarse para mejorar adicionalmente la afinidad de una muteína de Tlc por IL-17A o IL-23p19. Además, pueden introducirse mutaciones con el objeto de modular ciertas características de la muteína, tal como para mejorar la estabilidad del plegamiento, la estabilidad en suero, la resistencia de la proteína o la solubilidad en agua o para reducir la tendencia a la agregación, si es necesario. Por ejemplo, residuos de cisteína que se producen de manera natural pueden mutarse a otros aminoácidos para prevenir la formación de puentes disulfuro. Las posibilidades a modo de ejemplo de una mutación de este tipo para introducir un residuo de cisteína dentro de la secuencia de aminoácidos de una muteína de Tlc incluyen las sustituciones Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys y Glu 131 → Cys. El resto tiol generado en la parte lateral de cualquiera de las posiciones de aminoácidos 40, 73, 90, 95 y/o 131 pueden usarse para PEGilar la muteína, por ejemplo, con el objeto de aumentar la semivida en suero de una muteína de Tlc respectiva.

Una muteína de lipocalina dada a conocer en el presente documento es una muteína de lipocalina 2 humana. El término "lipocalina 2 humana" o "Lcn 2 humana" o "NGAL humana" tal como se usa en el presente documento se refiere a la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos humana madura (NGAL) con el número de registro de SWISS-PROT/UniProt Data Bank P80188. Una muteína de lipocalina 2 humana de la divulgación puede designarse también en el presente documento como "una muteína de hNGAL". La secuencia de aminoácidos mostrada en el número de registro de SWISS-PROT/UniProt Data Bank P80188 puede usarse como "secuencia de referencia" preferida, más preferiblemente la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 se usa como secuencia de referencia.

Una muteína de lipocalina que se une a IL-17A o IL-23p19 con afinidad detectable puede incluir al menos una sustitución de aminoácido de un residuo de cisteína nativo por otro aminoácido, por ejemplo, un residuo de serina. Una muteína de lipocalina que se une a IL-17A o IL-23p19 con afinidad detectable puede incluir uno o más residuos de cisteína no nativos que sustituyen a uno o más aminoácidos de una lipocalina silvestre. En un ejemplo particular adicional, una muteína de lipocalina según la divulgación incluye al menos dos sustituciones de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de cisteína, para formar de este modo uno o más puentes de cisteína. En algunos ejemplos, dicho puente de cisteína puede conectar al menos dos regiones de bucle. La definición de estas regiones se usa en el presente documento según Flower (Flower, 1996, citado anteriormente, Flower, *et al.*, 2000, citado anteriormente) y Breustedt *et al.* (2005, citado anteriormente).

Las proteínas de la divulgación, que están dirigidas contra o son específicas para IL-17A o IL-23p19, incluyen cualquier número de muteínas de proteínas de unión específica que se basan en un armazón proteico definido. Preferiblemente, el número de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, que se intercambia, deleciona o se inserta es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, tal como 25, 30, 35, 40, 45 o 50, prefiriéndose 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 y prefiriéndose incluso más 9, 10 u 11. Sin embargo, se prefiere que una muteína de lipocalina de la divulgación sea aún capaz de unirse a IL-17A o IL-23p19, en particular IL-17A humana o IL-23p19 humana.

En un aspecto, la presente divulgación incluye diversas muteínas de lipocalinas que se unen a IL-17A o IL-23p19 con al menos afinidad detectable. En este sentido, IL-17A o IL-23p19 pueden considerarse un ligando no natural de la lipocalina silvestre de referencia, en donde "ligando no natural" se refiere a un compuesto que no se une a lipocalinas silvestres en condiciones fisiológicas. Mediante la modificación por ingeniería genética de lipocalinas silvestres con una o más mutaciones en ciertas posiciones de la secuencia, los presentes inventores han demostrado que es posible una alta afinidad y alta especificidad por el ligando no natural, por ejemplo IL-17A o IL-23p19. En 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso más tripletes de nucleótidos que codifican para ciertas posiciones de secuencia en las lipocalinas silvestres, puede llevarse a cabo una mutagénesis aleatoria a través de sustitución en estas posiciones por un subconjunto de tripletes de nucleótidos.

Además, las muteínas de lipocalinas de la divulgación pueden tener un residuo de aminoácido mutado en una cualquiera o más, incluyendo al menos en cualesquiera una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, de las posiciones de secuencia que corresponden a ciertas posiciones de secuencia de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina de referencia.

Una proteína de la divulgación puede incluir la secuencia de aminoácidos silvestre (natural) del armazón de la proteína "original" (tal como una lipocalina) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutadas. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina según la divulgación puede portar también una o más mutaciones de aminoácidos en una posición/posiciones de secuencia siempre que tal mutación, al menos esencialmente, no obstaculice o no interfiera con la actividad de unión y el plegamiento de la muteína. Tales mutaciones pueden lograrse muy fácilmente a nivel del ADN usando métodos convencionales establecidos (Sambrook, J. *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Ejemplos ilustrativos de alteraciones de la secuencia de aminoácidos son inserciones o deleciones así como sustituciones de aminoácidos. Tales sustituciones pueden ser conservativas, es decir un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido de propiedades químicamente similares, en particular respecto a la polaridad así como al tamaño. Los ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre los miembros de los siguientes grupos: 1) alanina, serina, y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina y valina; y 6) fenilalanina, tirosina y triptofano. Por otra parte, también es posible introducir alteraciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos. Además, en lugar de reemplazar residuos de aminoácidos individuales, es también posible o bien insertar o bien delecionar uno o más aminoácidos continuos de la estructura primaria de la lipocalina lagrimal humana siempre que estas deleciones o inserciones den como resultado una muteína plegada/funcional estable (por ejemplo, muteínas de Tlc con extremos N- y C-terminales truncados). En tal muteína, por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos se añaden o se delecionan en el extremo N- o C-terminal del polipéptido. Generalmente, una muteína de este tipo puede tener aproximadamente al menos el 70%, incluyendo al menos aproximadamente el 80%, tal como al menos aproximadamente el 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lagrimal humana madura. Como ejemplo ilustrativo, la presente divulgación también abarca muteínas de Tlc tal como se definieron anteriormente, en las cuales los primeros cuatro residuos de aminoácidos N-terminales de la secuencia de la lipocalina lagrimal humana madura (His-His-Leu-Leu; posiciones 1-4) y/o los dos últimos residuos de aminoácidos C-terminales (Ser-Asp; posiciones 157-158) de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura se han delecionado (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 43).

La secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina dada a conocer en el presente documento tiene una alta identidad de secuencia con la lipocalina de referencia en comparación con identidades de secuencia con otras lipocalinas. En este contexto general, la secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina de la divulgación es al menos sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina de referencia, con la condición de que posiblemente haya huecos (tal como se definen a continuación) en una alineación que son el resultado de adiciones o deleciones de aminoácidos. Una secuencia respectiva de una muteína de lipocalina de la divulgación, que es sustancialmente similar a las secuencias de la lipocalina de referencia, tiene, en algunos ejemplos, al menos el 70% de identidad u homología de secuencia, al menos el 75% de identidad u homología de secuencia, al menos el 80% de identidad u homología de secuencia, al menos el 82% de identidad u homología de secuencia, al menos el 85% de identidad u homología de secuencia, al menos el 87% de identidad u homología de secuencia o al menos el 90% de identidad u homología de secuencia incluyendo al menos el 95% de identidad u homología de secuencia, con la secuencia de la lipocalina de referencia, con la condición de que la posición o secuencia alterada se conserve y que sean posibles uno o más huecos.

Tal como se usa en el presente documento, una muteína de lipocalina de la divulgación "se une específicamente a" una diana (por ejemplo, IL-17A o IL-23p19) si es capaz de discriminar entre esa diana y una o más dianas de referencia, ya que la especificidad de unión no es absoluta, sino una propiedad relativa. La "unión específica" puede determinarse, por ejemplo, según inmunotransferencias de tipo Western, pruebas de ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC y exploraciones de péptidos.

En una realización, las muteínas de lipocalinas de la divulgación están fusionadas en su extremo N-terminal y/o C-terminal a una pareja de fusión que es un dominio de proteína que extiende la semivida en suero de la muteína. En realizaciones particulares adicionales, el dominio de proteína es una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un dominio de unión a albúmina, un péptido de unión a albúmina o una proteína de unión a albúmina.

En otra realización, las muteínas de lipocalinas de la divulgación están conjugadas con un compuesto que extiende la semivida en suero de la muteína. Más preferiblemente, la muteína está conjugada con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una molécula de polialquilenglicol, un hidroxietilalmidón, una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un dominio de unión a albúmina, un péptido de unión a albúmina y una proteína de unión a albúmina.

En aún otra realización, la presente divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una

secuencia de nucleótidos que codifica para una muteína de lipocalina de la invención. La divulgación comprende una célula huésped que contiene dicha molécula de ácido nucleico.

Una muteína de Tlc según la presente divulgación puede obtenerse por medio de mutagénesis de una forma que se produce de manera natural de lipocalina lagrimal humana. Una muteína de hNGAL según la presente divulgación puede obtenerse por medio de mutagénesis de una forma que se produce de manera natural de lipocalina 2 humana. En algunos ejemplos de la mutagénesis, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, cualquier sustitución, incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones a modo de ejemplo a continuación se contempla siempre que la muteína de lipocalina retenga su capacidad de unirse a IL-17A o IL-23p19, y/o tenga una identidad con la entonces secuencia sustituida que es de al menos el 60%, tal como al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% o identidad superior con la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lagrimal humana madura o la lipocalina 2 humana madura, respectivamente.

A. Muteínas de lipocalina con afinidad de unión por interleucina-17A (IL-17A, sinónimo con IL-17)

En un aspecto, la presente divulgación proporciona muteínas de lipocalina humana que se unen a IL-17A humana (la misma que "IL-17") y aplicaciones útiles de la misma. Las proteínas de unión descritas en el presente documento pueden unirse al homodímero de IL-17A humana (lo mismo que "IL-17 A/A") y/u otros heterodímeros de IL-17A humana y el homólogo de IL-17F humana (el mismo que "IL-17 A/F"). La divulgación también proporciona métodos de preparación de proteínas de unión a IL-17A descritas en el presente documento así como composiciones que comprenden tales proteínas. Las proteínas de unión a IL-17A de la divulgación así como composiciones de las mismas pueden usarse en métodos de detección de IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) en una muestra o en métodos de unión a IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) en un sujeto. No se han descrito previamente tales muteínas de lipocalinas humanas que tengan estas características dirigidas a los usos proporcionados por la presente divulgación.

Una realización de la presente divulgación se refiere a una muteína de lipocalina que es capaz de unirse a interleucina-17A (IL-17A) con una afinidad medida por una K_D de aproximadamente 1 nM o menor, tal como 0,8 nM, cuando se mide en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 1.

En algunas otras realizaciones, la muteína de lipocalina es capaz de inhibir la unión de IL-17A a su receptor IL-17RA con un valor de CI50 de aproximadamente 100 pM o menor, tal como 75 pM, en un formato de ELISA de competición esencialmente descrito en el ejemplo 3.

En algunas realizaciones particulares, la muteína de lipocalina de unión a IL-17A tiene reactividad cruzada con IL-17A humana, IL-17A de cynomolgus e IL-17A de mono tití.

En aún algunas realizaciones adicionales, una muteína de lipocalina de la divulgación es capaz de bloquear la unión de IL-17A a su receptor IL-17RA. En algunas realizaciones adicionales, la muteína de lipocalina tiene un valor de CE50 promedio al menos tan bueno como (es decir, donde la diferencia es menor de 0,1 nM), o superior al valor de CE50 de un anticuerpo de referencia, cuando dicha muteína de lipocalina y el anticuerpo de referencia se miden en un ensayo esencialmente como se describe en el ejemplo 5. En algunas realizaciones, el anticuerpo de referencia es un polipéptido que comprende (i) SEQ ID NO: 53 o 55 como primera subunidad y (ii) SEQ ID NO: 54 o 56 como segunda subunidad. La muteína de lipocalina puede tener un valor de CI50 promedio de aproximadamente 0,13 nM o incluso menor en el ensayo cuando al mismo tiempo el anticuerpo de referencia tiene un valor de CE50 de aproximadamente 2,33 nM o menor en el ensayo, tal como aproximadamente 0,12 nM.

En algunas otras realizaciones, una muteína de lipocalina de unión a IL-17A de la presente divulgación es capaz de unirse a IL-17A con una mayor afinidad que la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 42, medida mediante una menor K_D de dicha primera muteína de lipocalina que la K_D de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 42, por ejemplo, en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 1. En algunas realizaciones adicionales, una muteína de lipocalina de unión a IL-17A de la presente divulgación es capaz de inhibir la unión de IL-17A a su receptor IL-17RA con un menor valor de CE50 que el de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 42, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 5.

1. Muteínas de lipocalina a modo de ejemplo con afinidad de unión por interleucina-17A (IL-17A)

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a muteínas de lipocalina lagrimal humana novedosas, de unión específica, dirigidas contra, o específicas para, interleucina-17A (IL-17A). Las muteínas de lipocalina lagrimal humana dadas a conocer en el presente documento pueden usarse con propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico. Una muteína de lipocalina lagrimal humana de la divulgación puede también designarse en el presente documento como "una muteína de Tlc". Tal como se usa en el presente documento, una muteína de Tlc de la divulgación "se une específicamente a" una diana (por ejemplo, en este caso IL-17A) si es capaz de discriminar entre la diana y una o más dianas de referencia, ya que la especificidad de unión no es una propiedad absoluta, sino relativa. La "unión específica" puede determinarse, por ejemplo, según inmunotransferencias de tipo Western, pruebas de ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC y exploraciones de péptidos.

En este sentido, la divulgación proporciona una o más muteínas de Tlc que son capaces de unirse a interleucina-17A (IL-17A) con una afinidad medida por una KD de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 0,1 nM o menor. Más preferiblemente, las muteínas de Tlc pueden tener una afinidad medida por una KD de aproximadamente 1 nM, 0,8 nM, 0,6 nM, 100 pM o menor.

5 Tal muteína de Tlc incluye un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 26-33, 56, 58, 60-61, 64, 92, 101, 104-106, 108, 111, 114 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura (número de registro de SWISS-PROT Data Bank P31025; SEQ ID NO: 41).

10 Tal muteína de Tlc puede incluir adicionalmente un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 101, 111, 114 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura (SEQ ID NO: 41).

15 La muteína de Tlc puede contener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en una o más posiciones de secuencia correspondientes a las posiciones de secuencia 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 56, 58, 60, 61, 64, 92, 101, 104, 105, 106, 108, 111, 114 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura (SEQ ID NO: 41).

20 La divulgación se refiere a un polipéptido, en donde dicho polipéptido es una muteína de Tlc, en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura, que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 26-33, 56, 58, 60-61, 64, 92, 101, 104-106, 108, 111, 114 y 153 y en donde dicho polipéptido se une a IL-17A, en particular IL-17A humana.

25 Una muteína de lipocalina según la divulgación puede incluir al menos una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo por, por ejemplo, un residuo de serina. En algunos ejemplos, una muteína de Tlc según la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo en las posiciones 61 y/o 153 por un residuo de serina. En este contexto debe indicarse que se ha hallado que la eliminación del enlace disulfuro estructural (al nivel de una respectiva biblioteca de ácidos nucleicos virgen) de la lipocalina lagrimal silvestre que se forma mediante los residuos de cisteína 61 y 153 (véase Breustedt, *et al.*, 2005, citado anteriormente) puede proporcionar muteínas de lipocalina lagrimal que no solo están plegadas en forma estable sino que también son capaces de unirse a un ligando no natural dado con alta afinidad. Sin querer quedar restringirse a la teoría, se cree también que la eliminación del enlace disulfuro estructural proporciona la ventaja adicional de permitir la generación (espontánea) o introducción deliberada de enlaces disulfuro artificiales no naturales dentro de las muteínas de la divulgación, aumentando de ese modo la estabilidad de las muteínas. Por ejemplo, una muteína de Tlc según la invención incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo en la posición 101 por un residuo de serina. Adicionalmente, una muteína según la invención incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de arginina nativo en la posición 111 por un residuo de prolina. Una muteína según la invención incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de lisina nativo en la posición 114 por un residuo de triptofano.

40 Una muteína de Tlc según la divulgación puede incluir adicionalmente, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lagrimal humana madura (número de registro de SWISS-PROT Data Bank P31025), una o más, incluyendo al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece o al menos catorce sustituciones de aminoácidos de residuos de aminoácidos nativos por residuos de cisteína en cualquiera de las posiciones 26-33, 56, 58, 60-61, 64, 92, 101, 104-106, 108, 111, 114 y 153 de la lipocalina lagrimal humana madura.

50 En algunos ejemplos, una muteína según la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de cisteína en las posiciones 28 o 105 con respecto a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lagrimal humana madura. En algunos ejemplos una muteína según la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de cisteína en las posiciones 28 o 105 con respecto a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lagrimal humana madura. Una muteína según la invención incluye una sustitución de aminoácidos de un aminoácido nativo por dos residuos de cisteína en las posiciones 28 y 105 con respecto a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lagrimal humana madura.

55 En algunos ejemplos, una muteína de Tlc según la divulgación incluye un aminoácido sustituido de al menos uno o ambos de los residuos de cisteína que están en cada una de las posiciones de secuencia 61 y 153 por otro aminoácido y la mutación de al menos tres residuos de aminoácido en una cualquiera de las posiciones de secuencia 26-33, 56, 58, 60-61, 64, 92, 101, 104-106, 108, 111, 114 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura (número de registro de SWISS-PROT Data Bank P31025). Las posiciones 26-34 están incluidas en el bucle AB, la posición 55 está situada justo en el extremo de una hoja beta y las siguientes posiciones 56-58 así como 60-61 y 64 están incluidas en el bucle CD. Las posiciones 104-108 están incluidas en el bucle GH en el sitio de unión en el extremo abierto de la estructura de barril β de la lipocalina lagrimal humana madura. La definición de estas regiones se usa en el presente documento según Flower (Flower, 1996, citado anteriormente, Flower, *et al.*, 2000, citado anteriormente) y Breustedt *et al.* (2005, citado anteriormente). En algunos ejemplos, la muteína de Tlc según la divulgación incluye las sustituciones de aminoácidos Cys 61 \rightarrow Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Gly, Gln, Asp, Asn, Leu, Tyr, Met, Ser, Pro o Trp y Cys 153 \rightarrow Ser o Ala. Una sustitución de este tipo ha demostrado ser útil para prevenir la

formación del puente disulfuro que se produce de manera natural que une Cys 61 y Cys 153, y así facilitar la manipulación de la muteína. Sin embargo, las muteínas de lipocalina lagrimal que se unen a IL-17A y que tienen el puente disulfuro formado entre Cys 61 y Cys 153 son también parte de la presente divulgación.

5 Una muteína de Tlc de unión a IL-17A según la invención incluye, en las posiciones de secuencia 26-33, 56, 58, 60-61, 64, 92, 101, 104-106, 108, 111, 114 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura (SEQ ID NO: 41), los siguientes residuos de aminoácidos mutados: Arg 26 → Phe; Glu 27 → Trp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Ser; Glu 30 → Gly; Met 31 → Ile; Asn 32 → His; Leu 33 → Glu; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Glu; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Leu; Val 64 → Phe; His 92 → Arg; Cys101 → Ser; Glu 104 → Asp; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; deleción de Lys 108; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; y Cys 153 → Ser.

En realizaciones particulares adicionales, una muteína de Tlc de la divulgación comprende una secuencia de aminoácidos tal como se detalla en una cualquiera de SEQ ID NO: 1.

15 En realizaciones particulares adicionales, una muteína de Tlc de la divulgación tiene identidad de al menos un 85% o mayor con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1.

La divulgación también incluye homólogos estructurales de una muteína de Tlc que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, homólogos estructurales que tienen una homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia de más de aproximadamente el 60%, preferiblemente más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 92% y lo más preferible más del 95% en relación con dicha muteína de Tlc.

25 En algunas realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona una muteína de lipocalina que se une a IL-17A con una afinidad medida por una KD de aproximadamente 1 nM o menor, en donde la muteína de lipocalina tiene al menos el 90% o más, tal como el 95%, de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

2. Aplicaciones de muteínas de lipocalina con afinidad de unión por interleucina-17A (IL-17A)

30 La IL-17A es una citocina proinflamatoria producida por un subconjunto de células T de memoria (llamadas Th17) que se ha implicado en la patogénesis de muchos trastornos, por ejemplo esclerosis múltiple (EM) (Hellings, P. W. *et al.*, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28 (2003) 42-50; Matusevicius, D. *et al.*, Multiple Sclerosis 5 (1999) 101-104), artritis reumatoide (AR) (Ziolkovska, M. *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 2832-38; Kotake, S. *et al.*, J. Clin. Invest. 103 (1999) 1345-52; Hellings, P. W. *et al.*, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28 (2003) 42-50). La IL-17A desempeña un papel en la inducción de otras citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión (Komiyama, Y. *et al.*, J. Immunol. 177 (2006) 566-573), psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y rechazo de trasplantes.

40 La IL-17A está implicada en la inducción de respuestas proinflamatorias e induce o media en la expresión de una variedad de otras citocinas, factores y mediadores, incluyendo factor de necrosis tisular-alfa (TNF- α), IL-6, IL-8, IL-1 β , factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), prostaglandina E2 (PGE2), IL-10, IL-12, antagonista de IL-1R, factor inhibitorio de leucemia y estromelina (Yao *et al.*, J. Immunol, 155(12): 5483-5486 (1995); Fossiez *et al.*, J. Exp. Med., 183(6): 2593-2603 (1996); Jovanovic *et al.*, J. Immunol, 160: 3513-3521 (1998); Teunissen *et al.*, J. Investig. Dermatol, 111: 645-649 (1998); Chabaud *et al.*, J. Immunol, 161: 409-414 (1998)). La IL-17A también induce óxido nítrico en condrocitos y en explantes de osteoartritis humanos (Shalom-Barak *et al.*, J. Biol Chem., 273: 27467-27473 (1998); Attur *et al.*, Arthritis Rheum., 40: 1050-1053 (1997)). A través de su papel en la autoinmunidad mediada por células T, la IL-17A induce la liberación de citocinas, quimioquinas y factores de crecimiento (tal como se indicó anteriormente), es un importante orquestador local de la acumulación de neutrófilos y desempeña un papel en la destrucción de cartílago y hueso. Existe creciente evidencia de que seleccionar como diana la señalización de IL-17A puede ser útil en una variedad de enfermedades autoinmunitarias incluyendo artritis reumatoide (AR), psoriasis, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple (EM), enfermedad psoriásica, asma y lupus (SLE) (véase, por ejemplo, Aggarwal *et al.*, J. Leukoc. Biol, 71(1): 1-8 (2002); Lubberts *et al.*, "Treatment with a neutralizing anti-murine Interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion", Arthritis Rheum., 50: 650-659 (2004)).

55 Además, se conoce en la técnica que están implicados procesos inflamatorios e inmunorregulatorios en la patogénesis de diversas formas de enfermedad cardiovascular (Biasucci, L., *et al.*, Circulation 1999, 99:855-860; Albert, C, *et al.* Circulation 2002, 105:2595-9; Buffon, A., *et al.* NEJM 2002, 347:55-7; Nakajima, T., *et al.*, Circulation 2002, 105:570-5). Estudios recientes han establecido una base para tratar la enfermedad cardiovascular mediante la reducción de las respuestas inflamatorias e inmunorregulatorias de la enfermedad (Blankenberg, S., *et al.*, Circulation 2002, 106:24-30; Mallat, Z., *et al.*, Circulation 2001, 104:1598-603; Mallat, Z., *et al.*, Circ Res. 2001, 89:E41-5). La enfermedad cardiovascular abarca varios trastornos que afectan al músculo y/o vasos sanguíneos del corazón, vasos sanguíneos periféricos, músculos y diversos órganos.

65 Por tanto, existen en medicina numerosas posibles aplicaciones para las muteínas de Tlc de la divulgación. En un aspecto adicional, la divulgación se refiere al uso de una muteína de Tlc dada a conocer para detectar IL-17A

(incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) en una muestra así como un método de diagnóstico respectivo.

La presente divulgación también implica el uso de una o más muteínas de Tlc tal como se describe para la formación de complejos con IL-17A.

Por tanto, en otro aspecto de la divulgación, las muteínas dadas a conocer se usan para la detección de IL-17A. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se sospecha que contiene IL-17A, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las muteínas e IL-17A, y detectando el complejo mediante una señal adecuada.

La señal detectable puede estar provocada por un marcador, tal como se explicó anteriormente, o por un cambio de propiedades físicas debido a la unión, es decir la formación del complejo, en sí. Un ejemplo es la resonancia de plasmones superficiales, cuyo valor cambia durante la unión de parejas de unión de las cuales una está inmovilizada sobre una superficie tal como una lámina de oro.

Las muteínas dadas a conocer en el presente documento pueden usarse también para la separación de IL-17A. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se supone que contiene IL-17A, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las muteínas e IL-17A, y separando el complejo de la muestra.

En el uso de las muteínas dadas a conocer para la detección de IL-17A así como para la separación de IL-17A, las muteínas y/o IL-17A o un dominio o fragmento de las mismas pueden estar inmovilizados sobre una fase sólida adecuada.

En aún otro aspecto, la presente divulgación presenta un kit de diagnóstico o analítico que comprende una muteína de Tlc según la divulgación.

Además de su uso en diagnóstico, en aún otro aspecto, la divulgación abarca el uso de una muteína de la divulgación o una composición que comprende tal muteína para la unión de IL-17A en un sujeto y/o inhibición de la unión de IL-17A a su receptor en un sujeto.

En aún otro aspecto, la presente divulgación presenta un método de unión a IL-17A en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una o más muteínas de lipocalinas de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales muteínas.

En aún otro aspecto, la presente divulgación implica un método para inhibir la unión de IL-17A a su receptor en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una o más muteínas de lipocalinas de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales muteínas.

En el contexto de la presente divulgación, las muteínas de lipocalinas con afinidad de unión por IL-17A dadas a conocer pueden unirse a la IL-17A que existe como un homodímero, pero tales muteínas también pueden unirse a la IL-17A que existe como un heterodímero complejoado con la IL-17F homóloga para formar IL-17A/F heterodimérica. En una realización preferida, una muteína de lipocalina de la divulgación puede unirse con una afinidad detectable a IL-17A en complejo con IL-17F.

B. Muteínas de lipocalinas con afinidad de unión por interleucina-23p19 (IL-23p19)

Además, la presente divulgación satisface la necesidad de inhibidores alternativos de IL-23p19 proporcionando muteínas de lipocalinas humanas que se unen a IL-23p19 humana y aplicaciones útiles de las mismas. Por consiguiente, la divulgación también proporciona métodos de preparación y uso de las proteínas de unión a IL-23p19 dadas a conocer en la presente así como composiciones que pueden usarse en métodos de detección de IL-23p19 en una muestra o en métodos de unión de IL-23p19 en un sujeto. No se han descrito previamente tales muteínas de lipocalinas humanas que tengan estas características relacionadas con los usos proporcionados en la presente divulgación.

Un ejemplo de la presente divulgación se refiere a una muteína de lipocalina que es capaz de unirse a interleucina-23p19 (IL-23p19), con una afinidad medida por una KD de aproximadamente 1 nM o menor, tal como aproximadamente 0,6 nM, cuando se mide en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 6 o el ejemplo 13.

En algunos otros ejemplos, la muteína de lipocalina es capaz de inhibir la unión de IL-23 a su receptor IL-23R con un valor de CI50 de aproximadamente 0,55 nM o menor en un formato de ELISA de competición esencialmente descrito en el ejemplo 8 o el ejemplo 14.

En algunos ejemplos particulares, la muteína de lipocalina tiene reactividad cruzada tanto con IL-23 humana como con IL-23 de ratón.

En aún algunas realizaciones adicionales, una muteína de lipocalina de la divulgación es capaz de inhibir la unión de IL-23 a su receptor IL-23R. En algunos ejemplos adicionales, la muteína de lipocalina tiene un valor de CE50 promedio al menos tan bueno como (es decir, donde la diferencia es menor de 1,0 nM) o superior al valor de CE50 promedio de un anticuerpo de referencia, cuando dicha muteína de lipocalina y el anticuerpo de referencia se miden en un ensayo esencialmente tal como se describe en el ejemplo 10 o el ejemplo 15. En algunos ejemplos, el anticuerpo de referencia es un polipéptido que comprende (i) SEQ ID NO: 57 o 59 como primera subunidad y (ii) SEQ ID NO: 58 o 60 como segunda subunidad. La muteína de lipocalina puede tener un valor de CE50 promedio de aproximadamente 1,2 nM o incluso menor en el ensayo cuando al mismo tiempo el anticuerpo de referencia tiene un valor de CE50 de aproximadamente 3 nM o menor en el ensayo, tal como aproximadamente 1,2 nM.

En algunos otros ejemplos, una muteína de lipocalina de unión a IL-23p19 de la divulgación es más estable biofísicamente que la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 44.

1. Muteínas de lipocalinas a modo de ejemplo con afinidad de unión por interleucina-23p19 (IL-23p19)

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a muteínas de lipocalina 2 humana (Lcn2 o NGAL) novedosas, de unión específica dirigidas contra, o específicas para, interleucina-23p19 (IL-23p19). Las muteínas de lipocalina 2 humana dadas a conocer en el presente documento pueden usarse con propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico. Una muteína de lipocalina 2 humana de la divulgación puede designarse también en la presente como “una muteína de NGAL”. Tal como se usa en el presente documento, una muteína de Tlc de la divulgación “se une específicamente a” una diana (en este caso, IL-23p19) si es capaz de discriminar entre la diana y una o más dianas de referencia, ya que la especificidad de unión no es una propiedad absoluta, sino relativa. La “unión específica” puede determinarse, por ejemplo, según inmunotransferencias de tipo Western, pruebas de ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC y exploraciones de péptidos.

En este sentido, la divulgación proporciona una o más muteínas de NGAL que son capaces de unirse a interleucina-23p19 (IL-23p19) con una afinidad medida por una KD de aproximadamente 10 nM o menor. Más preferiblemente, las muteínas de NGAL pueden tener una afinidad medida por una KD de aproximadamente 1 nM o menor.

Una muteína de hNGAL de la divulgación incluye una sustitución en una o más posiciones que corresponden a la posición 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 75-77, 79, 81, 87, 96, 98, 100, 103, 106, 114, 120, 125, 127, 134 y 175 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 43).

En ejemplos particulares, una muteína de lipocalina de la divulgación comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, sustituciones en una posición de secuencia correspondiente a la posición de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 75-77, 79, 81, 87, 96, 98, 100, 103, 106, 114, 120, 125, 127, 134 y 175 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (número de registro de SWISS-PROT Data Bank P80188; SEQ ID NO: 43). Preferiblemente, se contempla que la divulgación se refiera a una muteína de lipocalina que comprende, además de una o más sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 36, 87 y/o 96 de la secuencia polipeptídica lineal de la NGAL humana madura, una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 75-77, 79, 81, 87, 96, 98, 100, 103, 106, 114, 120, 125, 127, 134 y 175 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura.

En aún algunos ejemplos adicionales, la divulgación se refiere a un polipéptido, en donde dicho polipéptido es una muteína de hNGAL, en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura, que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 75-77, 79, 81, 87, 96, 98, 100, 103, 106, 114, 120, 125, 127, 134 y 175, y en donde dicho polipéptido se une a IL-23p19, en particular IL-23p19 humana.

En algunos ejemplos, una muteína de hNGAL de unión a IL-23p19 de la divulgación incluye, en una cualquiera o más de las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 75-77, 79, 81, 87, 96, 98, 100, 103, 106, 114, 120, 125, 127, 134 y 175 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 43), uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos mutados: Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Arg; Leu 70 → Glu; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala o Val; Lys 75 → Thr; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Gln o Arg; Arg 81 → Gly; Asn 96 → Gly; Lys 98 → Glu; Tyr 100 → Met; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Phe; Asn 114 → Asp; Met 120 → Ile; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Tyr; y Lys 134 → Glu. En algunos ejemplos, una muteína de hNGAL de la divulgación incluye dos o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, incluso más o todos los residuos de aminoácidos mutados en esas posiciones de secuencia de la hNGAL madura.

Adicionalmente, una muteína de hNGAL de unión a IL-23p19 según la divulgación puede comprender también la siguiente sustitución: Cys 87 → Ser. Además, una muteína de hNGAL de unión a IL-23p19 según la divulgación puede comprender también la siguiente sustitución: Cys 76 → Tyr o Arg. Además, una muteína de hNGAL de unión a IL-23p19 según la divulgación puede comprender también la siguiente sustitución: Cys 175 → Ala.

En algunos ejemplos adicionales, una muteína de hNGAL de la divulgación, que se une a IL-23p19, incluye uno de los siguientes conjuntos de reemplazos de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL

madura:

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Arg; Leu 70 → Glu; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala; Lys 75 → Thr; Cys 76 → Tyr; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Gln; Arg 81 → Gly; Asn 96 → Gly; Lys 98 → Glu; Tyr 100 → Met; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Phe; Met 120 → Ile; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Tyr; y Lys 134 → Glu;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Arg; Leu 70 → Glu; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Val; Lys 75 → Thr; Cys 76 → Arg; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Gly; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Met; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Tyr; y Lys 134 → Glu; o

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Arg; Leu 70 → Glu; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Val; Lys 75 → Thr; Cys 76 → Tyr; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Gln; Arg 81 → Gly; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Met; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Phe; Asn 114 → Asp; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Tyr; y Lys 134 → Glu.

En la región residual, es decir la región que difiere de las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 75-77, 79, 81, 87, 96, 98, 100, 103, 106, 114, 120, 125, 127, 134 y 175, una muteína de hNGAL de la divulgación puede incluir la secuencia de aminoácidos silvestre (natural) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutados.

En ejemplos particulares adicionales, una muteína de lipocalina según la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 45-46 o un fragmento o variante de la misma.

La secuencia de aminoácidos de una muteína de hNGAL de unión a IL-23p19 de la divulgación puede tener una alta identidad de secuencia, tal como al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 82%, al menos el 85%, al menos el 87%, al menos el 90% de identidad, incluyendo al menos el 95% de identidad, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 45-46.

La divulgación también incluye homólogos estructurales de una muteína de hNGAL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 45-46, homólogos estructurales que tienen una homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia de más de aproximadamente el 60%, preferiblemente más del 65%, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 92% y lo más preferible más del 95% en relación con dicha muteína de hNGAL.

En algunos ejemplos particulares, la presente divulgación proporciona una muteína de lipocalina que se une a IL-23p19 con una afinidad medida por una KD de aproximadamente 1 nM o menor, en donde la muteína de lipocalina tiene al menos el 90% o más, tal como el 95%, de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

2. Aplicaciones de muteínas de lipocalinas con afinidad de unión por interleucina-23p19 (IL-23p19)

La interleucina-23 (IL-23) es una citocina heterodimérica compuesta de una subunidad única, p19 (denominada en el presente documento indistintamente "IL-23p19"), y la subunidad p40, que se comparte con la interleucina-12 (IL-12) (Oppmann, *Immunity* 13:115 (2000)). Se ha hallado que la IL-23 estimula la producción y/o mantenimiento de IL-17A e IL-17F a partir de células T CD4 activadas en lo que ahora se ha denominado un "nuevo" subconjunto T-auxiliar (*T-helper*, Th), designado Th17. Una revisión de la citocina IL-23 y el receptor biológico se encuentra en Holscher, *Curr. Opin. Invest. Drugs* 6:489 (2005) y Langrish *et al.* *Immunol Rev.* 202:96 (2004). De manera similar a los linajes Th1 y Th2, es lo más probablemente las células Th17 han evolucionado para proporcionar inmunidad adaptativa frente a clases específicas de patógenos, tales como bacterias extracelulares. Sin embargo, respuestas inapropiadas de Th17 han estado fuertemente implicadas en una lista creciente de trastornos autoinmunitarios, incluyendo esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria y psoriasis.

En este sentido, la IL-23 promueve un estado de activación de células T CD4 distintivo caracterizado por la producción de interleucina-17 (J. Biol. Chem. 278:1910-191 (2003); véase también Langrish *et al.*). La IL-23 dirige una población de células T patógenas que induce inflamación autoinmunitaria (J. Exp. Med. 201: 233-240 (2005); Starnes *et al.* "Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production" J. Immunol. 167:4137-4140 (2001)).

Por tanto, existen en medicina numerosas posibles aplicaciones para las muteínas con afinidad de unión por IL-23p19 de la divulgación. En un aspecto adicional, la descripción se refiere al uso de dicha muteína dada a conocer para detectar IL-23p19 en una muestra así como un método de diagnóstico respectivo.

La presente divulgación también implica el uso de una o más muteínas con afinidad de unión por IL-23p19 tal como se describe para la formación de complejos con IL-23p19.

Por tanto, en otro aspecto de la divulgación, las muteínas dadas a conocer se usan para la detección de IL-23p19. Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se sospecha que contiene IL-23p19, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las muteínas e IL-23p19, y detectando el complejo mediante una señal adecuada.

La señal detectable puede estar provocada por un marcador, tal como se explicó anteriormente, o por un cambio en propiedades físicas debido a la unión, es decir la formación del complejo, en sí. Un ejemplo es la resonancia de plasmones superficiales, cuyo valor cambia durante la unión de parejas de unión de los cuales una está inmovilizada sobre una superficie tal como una lámina de oro.

Las muteínas dadas a conocer en el presente documento pueden usarse también para la separación de IL-23p19. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se supone contiene IL-23p19, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las muteínas e IL-23p19, y separando el complejo de la muestra.

En el uso de las muteínas dadas a conocer para la detección de IL-23p19 así como para la separación de IL-23p19, las muteínas y/o IL-23p19 o un dominio o fragmento de las mismas pueden estar inmovilizados sobre una fase sólida adecuada.

Por consiguiente, puede determinarse la presencia o ausencia de una molécula tal como IL-23p19, por ejemplo, en una muestra, así como su concentración o nivel.

En aún otro aspecto, la presente divulgación presenta un kit de diagnóstico o analítico que comprende una muteína con afinidad de unión por IL-23p19 según la divulgación.

Además de su uso en diagnóstico, en aún otro aspecto, la divulgación comprende el uso de una muteína de este tipo de la divulgación o una composición que comprende tal muteína para la unión a IL-23p19 en un sujeto y/o inhibición de la unión de IL-23 a su receptor en un sujeto.

En aún otro aspecto, la presente divulgación presenta un método de unión a IL-23p19 en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una o más muteínas de lipocalinas con afinidad de unión por IL-23p19 de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden dicha muteína.

En aún otro aspecto, la presente divulgación implica un método para inhibir la unión de IL-23 a su receptor en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una o más muteínas de lipocalinas con afinidad de unión por IL-23p19 de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden una muteína de este tipo.

C. Composiciones que comprenden una muteína de lipocalina de unión a IL-17A y/o una muteína de lipocalina de unión a IL-23p19 y usos de las muteínas de lipocalinas

IL-17A e IL-23 son citocinas implicadas en la inflamación. La interleucina-17A humana (también conocida como "IL-17", incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) es una citocina que estimula la expresión de interleucina-6 (IL-6), molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1), interleucina-8 (IL-8), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), y expresión de prostaglandina E2, y desempeña un papel en la maduración preferente de precursores hematopoyéticos CD34+ a neutrófilos (Yao *et al.*, J. Immunol 755:5483 (1995); Fossiez *et al.*, J. Exp. Med. 183:2593 (1996)). La interleucina-23 humana (también conocida como "IL-23") es una citocina que se ha notificado que promueve la proliferación de células T, en particular células T de memoria.

Se ha notificado que tanto la IL-17A (incluyendo IL-17A en complejo con IL-17F, también denominada IL-17 A/F) como la IL-23 desempeñan papeles importantes en muchas enfermedades autoinmunitarias, tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y psoriasis. Tanto IL-23 como IL-17A se sobreexpresan en el sistema nervioso central de humanos con esclerosis múltiple y en ratones sometidos a un modelo animal de esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). La sobreexpresión se observa en ratones cuando se induce EAE mediante péptido 35-55 o el péptido proteolípido (PLP) de la glicoproteína de mielínoligodendrocitos (MOG). Además, la neutralización de o bien IL-23p19 o bien IL-17A da como resultado una mejora en los síntomas de EAE en ratones (Park *et al.*, Immunol 6:1133 (2005); Chen *et al.*, J Clin Invest. 116:1317 (2006)).

También se ha demostrado que la IL-17A y células Th17 pueden producirse a partir de fuentes independientes de IL-23, y el desarrollo *in vivo* de una respuesta efectora de IL-17 ha demostrado ser independiente de IL-23 (Mangan *et al.*, Nature 441:231 (2006)). La neutralización de IL-23 teóricamente eliminaría las células productoras de IL-17A existentes, pero no prevendría completamente el desarrollo de nuevas células Th17.

La presente divulgación, por tanto, se refiere a la unión de ambas de estas citocinas proinflamatorias, IL-17A e IL-23p19, ya que la unión tanto de IL-23 (por medio de p19) como de IL-17A es más eficaz terapéuticamente que la neutralización de IL-23p19 sola o IL-17A sola y, así, beneficiosa para el tratamiento eficaz de enfermedades

inflamatorias.

Aunque se han descrito anticuerpos contra IL-17A y/o IL-23p19, estos enfoques basados en anticuerpos aún tienen varios inconvenientes serios tales como la necesidad de sistemas complejos de producción en células de mamíferos, una dependencia de la estabilidad del enlace disulfuro, la tendencia a la agregación de algunos fragmentos de anticuerpos, limitada solubilidad y por último, pero no menos importante, pueden provocar respuestas inmunitarias no deseadas aun cuando se inmunizan. Por tanto, existe la necesidad no satisfecha de desarrollar pequeñas proteínas globulares tales como lipocalinas como armazones para la generación de una clase novedosa de proteínas de unión a IL-17A o IL-23p19, por ejemplo muteínas de lipocalinas con afinidad de unión por IL-17A o IL-23p19.

Por consiguiente, un objeto de la presente divulgación es proporcionar muteínas de lipocalinas humanas que se unen a IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) y/o IL-23p19 y que pueden usarse en aplicaciones farmacéuticas. La divulgación también proporciona una o más composiciones que comprenden tales muteínas de lipocalinas y, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéutica o diagnósticamente aceptables (por ejemplo adyuvantes, diluyentes o portadores). Las muteínas de lipocalinas de la divulgación así como las composiciones de las mismas pueden usarse en métodos de detección de IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) y/o IL-23p19 en una muestra o en métodos de unión de IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) y/o IL-23p19 en un sujeto.

Como se comentó anteriormente, la unión de IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) e IL-23p19 concomitantemente con muteínas de lipocalinas específicas para IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) o IL-23p19, respectivamente, podría superar algunos de los efectos mediados por hipoxia que podría inducir, respectivamente, la unión a IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) sola o la unión a IL-23p19 sola. La presente divulgación, por tanto, abarca el uso de (i) una primera muteína de lipocalina específica para IL-17A y (ii) una segunda muteína de lipocalina específica para IL-23p19, para la unión a IL-17A e IL-23p19 en un sujeto. Tal uso incluye una etapa de administración a un sujeto de una cantidad eficaz de (i) una primera muteína de lipocalina específica para IL-17A y (ii) una segunda muteína de lipocalina específica para IL-23p19.

En el contexto de la presente divulgación, la muteína de lipocalina específica para IL-17A puede unirse a IL-17A que existe como un homodímero (es decir, IL-17 A/A), pero también puede unirse a IL-17A que existe como un heterodímero complejo con la IL-17F homóloga para formar IL-17A/F heterodimérica. En una realización preferida, dicha muteína de lipocalina se une al complejo de IL-17A e IL-17F.

La primera muteína de lipocalina y la segunda muteína de lipocalina pueden administrarse en combinación, incluyendo de manera concurrente, concomitante o en serie. En algunas realizaciones, la primera muteína de lipocalina y la segunda muteína de lipocalina pueden incluirse en una composición que puede administrarse. La composición puede incluir una cantidad eficaz de la primera y la segunda muteína de lipocalina como principios activos, en asociación con al menos un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. La primera muteína de lipocalina y la segunda muteína de lipocalina pueden también administrarse independientemente entre sí, incluyendo a intervalos individuales en puntos de tiempo independientes.

En algunas realizaciones, la presente divulgación también se refiere a una composición que comprende una primera muteína de lipocalina específica para IL-17A según la invención y (ii) una segunda muteína de lipocalina específica para IL-23p19, composición que puede usarse en un método de unión de IL-17A e IL-23p19 por ejemplo en un sujeto. Además, tal composición puede usarse en un método de detección de IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) e IL-23p19 por ejemplo en una muestra.

En algunas otras realizaciones, la presente divulgación se refiere a una combinación de una primera muteína de lipocalina y una segunda muteína de lipocalina. Una de estas muteínas de lipocalinas puede unirse a la IL-17A como una diana no natural dada según la invención. La otra muteína de lipocalina puede unirse a la IL-23p19 como una diana no natural dada con afinidad detectable. La respectiva muteína de lipocalina se une así a IL-17A o a IL-23p19, respectivamente, como una diana no natural dada. El término "diana no natural" se refiere a un compuesto, que no se une a la correspondiente lipocalina en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la primera muteína de lipocalina puede unirse a la IL-17A y la segunda muteína de lipocalina puede unirse a la IL-23p19, o viceversa. La combinación de la primera muteína de lipocalina y la segunda muteína de lipocalina puede proporcionarse en diversas formas.

La muteína de lipocalina específica para IL-17A tal como se usa en la invención es capaz de unirse a IL-17A según la invención. En algunas realizaciones, la muteína de lipocalina específica para IL-23p19 tal como se usa en la divulgación es capaz de unirse a IL-23p19 con afinidad detectable, es decir con una constante de disociación de al menos 200 nM, incluyendo aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 25 nM o aproximadamente 15 nM. En algunas realizaciones adicionalmente preferidas, una muteína de lipocalina de la combinación según la divulgación se une a IL-23p19, con una constante de disociación para IL-23p19 de al menos aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 0,1 nM, aproximadamente 10 pM, o incluso menor. La presente divulgación, así, proporciona una combinación de (i) una muteína de una lipocalina que tiene una afinidad particularmente alta por IL-17A y (ii) una muteína de una lipocalina que tiene una afinidad particularmente elevada por IL-23p19.

Las muteínas de lipocalinas con una afinidad detectable por IL-17A son muteínas de lipocalina lagrimal humana. Estos y otros detalles sobre muteínas de lipocalinas con una afinidad detectable por IL-17A pueden hallarse en la sección A de la presente divulgación.

5 En una realización particularmente preferida, una muteína de lipocalina que es específica para IL-17A se muestra en SEQ ID NO: 1.

10 En algunas realizaciones, las muteínas de lipocalinas con una afinidad detectable por IL-23p19 son muteínas de lipocalina lagrimal humana o muteínas de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos humana. Estos y otros detalles adicionales de muteínas de lipocalina con una afinidad detectable por IL-23p19 se han descrito en la sección B de la presente divulgación.

15 En una realización particularmente preferida, la muteína de lipocalina que es específica para IL-23p19 se muestra en una cualquiera de SEQ ID NO: 2, 45 y 46.

En aún otro aspecto, la presente divulgación presenta un método de unión de IL-17A e IL-23 en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de (i) una primera muteína de lipocalina específica para IL-17A y (ii) una segunda muteína de lipocalina específica para IL-23p19.

20 En aún otro aspecto, la presente divulgación implica un método para inhibir la unión de IL-17A e IL-23 a su(s) respectivo(s) receptor(es) en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de (i) una primera muteína de lipocalina específica para IL-17A y (ii) una segunda muteína de lipocalina específica para IL-23p19.

25 La presente divulgación también implica el uso de (i) una primera muteína de lipocalina específica para IL-17A y (ii) una segunda muteína de lipocalina específica para IL-23p19 para la formación de complejos con IL-17A e IL-23p19.

30 Por tanto, en otro aspecto de la divulgación, las muteínas descritas pueden usarse para la detección de IL-17A e IL-23p19. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto dos o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se sospecha que contiene IL-17A e IL-23p19, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las muteínas e IL-17A o entre las muteínas e IL-23p19, respectivamente, y detectando el complejo mediante una señal adecuada.

35 La señal detectable puede estar provocada por un marcador, como se explicó anteriormente, o por un cambio en propiedades físicas debido a la unión, es decir la formación del complejo, en sí. Un ejemplo es la resonancia de plasmones superficiales, cuyo valor cambia durante la unión de parejas de unión de las cuales una está inmovilizada sobre una superficie tal como una lámina de oro.

40 Las muteínas dadas a conocer en el presente documento pueden usarse también para la separación de IL-17A e IL-23p19. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se supone que contiene IL-17A e IL-23p19, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las muteínas e IL-17A o entre las muteínas e IL-23, respectivamente, y separando el complejo de la muestra.

45 En el uso de las muteínas dadas a conocer para la detección de IL-17A e IL-23p19 así como para la separación de IL-17A e IL-23p19, las muteínas y/o IL-17A e IL-23p19 o un dominio o fragmento de las mismas pueden estar inmovilizados sobre una fase sólida adecuada.

50 Por consiguiente, puede determinarse la presencia o ausencia de IL-17A y/o IL-23p19, por ejemplo, en una muestra, así como su concentración o nivel.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit de partes. El kit incluye un primer y un segundo recipiente. El primer recipiente incluye la primera muteína de lipocalina y el segundo recipiente incluye la segunda muteína de lipocalina. En un aspecto, la divulgación se refiere a un kit que incluye, en uno o más recipientes, por separado o en mezcla, una muteína de lipocalina específica para IL-17A. En aún otro aspecto, la divulgación también se refiere a un kit que incluye, en uno o más recipientes, por separado o en mezcla, una muteína de lipocalina específica para IL-23p19. En algunos ejemplos, la divulgación se refiere a un kit que incluye, en uno o más recipientes, por separado o en mezcla, una muteína de lipocalina específica para IL-17A y una muteína de lipocalina específica para IL-23p19. En algunos ejemplos adicionalmente preferidos, el kit comprende un primer recipiente que incluye una primera muteína de lipocalina específica para IL-17A y un segundo contenedor que incluye una segunda muteína de lipocalina específica para IL-23p19. En algunos ejemplos el kit incluye además integralmente al mismo o como uno o más documentos separados, información relacionada con los contenidos del kit y el uso de las muteínas de lipocalinas. El kit puede incluir en algunos ejemplos una o más composiciones que se formulan para su reconstitución en un diluyente. Un diluyente de este tipo, por ejemplo un diluyente estéril, también puede estar incluido en el kit, por ejemplo dentro de un recipiente.

65

D. Proteínas de fusión con afinidad de unión por IL-17A y/o IL-23p19 y usos de las mismas

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades en cualquier orden: una subunidad tiene especificidad de unión por IL-17A y otra subunidad tiene especificidad de unión por IL-23p19.

Por ejemplo, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión que tiene restos proteicos con especificidad de unión por IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) e IL-23p19, respectivamente. En este sentido, una subunidad de dicha proteína de fusión puede comprender una muteína de lipocalina de la divulgación específica para IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) mientras que otra subunidad de dicha proteína de fusión puede comprender una muteína de lipocalina de la divulgación específica para IL-23p19.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades, donde cada una tiene una especificidad de unión para IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F). En algunos ejemplos, al menos una subunidad comprende una muteína de lipocalina específica para IL-17A. En algunos ejemplos, la proteína de fusión tiene una afinidad de unión por IL-17A mediante una KD de aproximadamente 1 nM o menor en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 2. En algunos ejemplos adicionales, la proteína de fusión es capaz de inhibir la unión de IL-17A a su receptor en un formato de ELISA de competición esencialmente descrito en el ejemplo 3 o en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 5.

En algunos ejemplos adicionales, cada una de las dos subunidades comprende una muteína de lipocalina específica para IL-17 A/A. En algunos ejemplos adicionales, cada una de las dos subunidades comprende una muteína de lipocalina específica para IL-17 A/F. Las dos muteínas de lipocalina pueden tener una secuencia de aminoácidos diferente. Por tanto, en algunos ejemplos, las dos muteínas de lipocalinas se unen a un epítipo diferente sobre IL-17A. En algunos otros ejemplos, sin embargo, las dos muteínas de lipocalinas pueden ser idénticas entre sí. Por ejemplo, una proteína de fusión de este tipo puede comprender dos secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En este sentido, la proteína de fusión puede tener la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, SEQ NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

En algunos ejemplos, una proteína de fusión de la divulgación que tiene dos subunidades que tienen especificidad de unión para IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) pueden presentar una mayor potencia que una única subunidad, debido a un efecto de avidéz de las dos subunidades, que se ocasiona por la naturaleza dimérica de la diana (por ejemplo IL17 A/A). En este sentido, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión bivalente. En aún otro aspecto, la presente divulgación también abarca una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades que tienen especificidad de unión para IL-23p19. En algunos ejemplos, al menos una subunidad comprende una muteína de lipocalina específica para IL-23p19. En algunos ejemplos, la proteína de fusión tiene una afinidad de unión por IL-23p19 mediante una KD de aproximadamente 10 nM o menor en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 7. En algunos ejemplos adicionales, la proteína de fusión es capaz de inhibir la unión de IL-23 a su receptor en un formato de ELISA de competición esencialmente descrito en el ejemplo 8 o el ejemplo 14 o en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 10 o el ejemplo 15.

En algunos ejemplos adicionales, cada una de las dos subunidades comprende una muteína de lipocalina específica para IL-23p19. Las dos muteínas de lipocalina pueden tener una secuencia de aminoácidos diferente. Por tanto, en algunos ejemplos, las dos muteínas de lipocalina se unen a un epítipo diferente sobre IL-23p19. En algunos otros ejemplos, sin embargo, las dos muteínas de lipocalina pueden ser idénticas entre sí.

En un aspecto adicional, la presente solicitud da a conocer una proteína de fusión que comprende (i) la parte Fc de una inmunoglobulina, incluyendo un anticuerpo humano de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG, y (ii) una muteína de lipocalina específica para IL-17A.

En otro aspecto, la presente solicitud da a conocer una proteína de fusión que comprende (i) la parte Fc de una inmunoglobulina, incluyendo un anticuerpo humano de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG, y (ii) una muteína de lipocalina específica para IL-23p19.

Muteínas de lipocalinas a modo de ejemplo específicas para IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) incluyen las dadas a conocer en la sección A de la presente divulgación. En una realización particularmente preferida, la muteína de lipocalina se muestra en SEQ ID NO: 1.

Muteínas de lipocalinas a modo de ejemplo específicas para IL-23p19 incluyen las dadas a conocer en la sección B de la presente divulgación. En un ejemplo particularmente preferido, la muteína de lipocalina se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 45 y 46.

En algunas realizaciones particulares, la muteína de lipocalina puede estar unida, por ejemplo, mediante un enlace peptídico, a los extremos C-terminal y/o N-terminal de la parte Fc de un anticuerpo humano (véase la figura 11). En una realización particular, una proteína de fusión de la divulgación puede comprender una muteína de lipocalina unida a la parte Fc de un anticuerpo IgG. En este sentido, una de tales proteínas de fusión comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16.

En aún una realización preferida, una proteína de fusión de la divulgación comprende los aminoácidos mostrados en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

5 En una realización relacionada, una o más proteínas de fusión de la divulgación son capaces de inhibir la unión de IL-17A y la unión de IL-23 a su(s) respectivo(s) receptor(es). En algunas realizaciones adicionales, una o más proteínas de fusión de la divulgación son capaces de acoplarse a IL-17A e IL-23p19 simultáneamente y, por tanto, de ese modo son capaces de inhibir la unión de IL-17A y la unión de IL-23 a su(s) respectivo(s) receptor(es) al mismo tiempo.

10 En este aspecto, la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades en cualquier orden, incluyendo una subunidad que comprende una muteína de lipocalina específica para IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) y una subunidad que comprende una muteína de lipocalina específica para IL-23p19. En algunas realizaciones adicionales, la proteína de fusión puede contener una subunidad adicional, subunidad que comprende una muteína de lipocalina específica para IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) o IL-23p19. En algunas realizaciones, dos muteínas de lipocalinas específicas para IL-17A, tal como se incluyen en dos subunidades diferentes de la proteína de fusión, pueden unirse a dos epítomos diferentes en la diana de IL-17A; alternativamente, las dos muteínas de lipocalinas específicas para IL-17A, tal como se incluyen en dos subunidades diferentes de la proteína de fusión, pueden tener la misma secuencia de aminoácidos y, por tanto, tener especificidad para el mismo epítomo en la diana de IL-17A. Una proteína de fusión de la divulgación que tiene dos subunidades que se unen a IL-17A puede presentar una unión más fuerte a IL-17A que una proteína de fusión que tiene solo una subunidad que se une a IL-17A, debido a un efecto de avidéz ocasionado por la naturaleza dimérica de la diana. De manera similar, dos muteínas de lipocalinas específicas para IL-23p19, tal como se incluyen en dos subunidades diferentes de la proteína de fusión, pueden unirse a epítomos diferentes en la diana de IL-23p19; alternativamente, las dos muteínas de lipocalinas específicas para IL-23p19, tal como se incluyen en dos subunidades diferentes de la proteína de fusión, pueden tener la misma secuencia de aminoácidos y, en consecuencia, la especificidad para el mismo epítomo en la diana de IL-23p19. Una proteína de fusión puede también incluir un ligador que une una subunidad a otra subunidad.

25 En algunas realizaciones, una subunidad de una proteína de fusión de la divulgación comprende una muteína de lipocalina dada a conocer en la sección A de la presente divulgación. En una realización particularmente preferida, la subunidad comprende una muteína de lipocalina mostrada en SEQ ID NO: 1.

30 En algunas realizaciones, una subunidad de una proteína de fusión de la divulgación comprende una muteína de lipocalina dada a conocer en la sección B de la presente divulgación. En una realización particularmente preferida, la subunidad comprende una muteína de lipocalina mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 45 y 46.

35 En algunas realizaciones, una proteína de fusión de la divulgación comprende una muteína de lipocalina dada a conocer en la sección A así como una muteína de lipocalina dada a conocer en la sección B.

40 En una realización particular, una proteína de fusión de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

En una realización particular, una proteína de fusión de la divulgación comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4.

45 En aún una realización preferida, una proteína de fusión de la forma de realización comprende los aminoácidos mostrados en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

50 En otro aspecto, la presente solicitud da a conocer una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades, en donde una subunidad tiene especificidad de unión para IL-17A o IL-23p19 y otra subunidad contiene un dominio de unión a albúmina (ABD) o un péptido de unión a albúmina. En algunas realizaciones, la subunidad tiene especificidad de unión para IL-17A y comprende una muteína de lipocalina específica para IL-17A de la invención. Además, la proteína de fusión puede comprender en cualquier orden (i) una subunidad específica para IL-17A, (ii) una subunidad específica para IL-23p19 y (iii) una subunidad que contiene un dominio de unión a albúmina bacteriano. En algunas realizaciones, la subunidad tiene especificidad de unión para IL-17A y comprende una muteína de lipocalina específica para IL-17A de la invención. En algunas otras realizaciones, la subunidad tiene especificidad de unión para IL-23p19 y comprende una muteína de lipocalina específica para IL-23p19 de la divulgación.

55 En algunas realizaciones, el dominio de unión a albúmina (ABD) puede ser una proteína G de estreptococos (König, T., & Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83) o un fragmento de la misma, por ejemplo tal como se muestra en SEQ ID NO: 14. En algunas otras realizaciones, el péptido de unión a albúmina es un péptido de unión a albúmina sérica humana derivado del dominio de unión a albúmina de la proteína G de estreptococos, por ejemplo, tal como se da a conocer en la solicitud PCT WO 2012/004384. En aún algunas realizaciones preferidas, el péptido de unión a albúmina comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15.

60 En particular, la presente divulgación proporciona una proteína de fusión, que es capaz de unirse tanto a albúmina sérica humana (HSA) como a IL-23p19 simultáneamente, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos

mostrada en SEQ ID NO: 7.

La presente divulgación proporciona una proteína de fusión, que es capaz de unirse tanto a HSA como a IL-17A simultáneamente, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10. En aún algunas realizaciones preferidas, tal proteína de fusión puede incluir dos muteínas de lipocalina específicas para IL-17A, por ejemplo, que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10.

Además, la presente solicitud proporciona una proteína de fusión, que es capaz de unirse a HSA, IL-17A e IL-23p19 simultáneamente, por ejemplo, cuando la proteína de fusión se mide en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 12. En algunas realizaciones adicionales, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o de SEQ ID NO: 9. En aún algunas realizaciones preferidas, tal proteína de fusión puede incluir dos muteínas de lipocalinas específicas para IL-17A, por ejemplo, que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades en cualquier orden: una subunidad tiene especificidad de unión para IL-17A o tiene especificidad de unión para IL-23p19 y otra subunidad tiene especificidad de unión para TNF, por ejemplo, que comprende una proteína de inhibición de TNF. Los factores de necrosis tumoral (o la familia de TNF) se refieren a un grupo de citocinas que pueden provocar muerte celular (apoptosis) tal como TNF-alfa (TNF- α y linfotoxina-alfa. Inhibidores de TNF a modo de ejemplo incluyen adalimumab, infliximab, etanercept, certolizumab pegol y golimumab. En algunas realizaciones adicionales, la subunidad específica para TNF comprende un anticuerpo anti-TNF- α , tal como el anticuerpo de SEQ ID NO: 61 y 62. En algunas realizaciones adicionales, la subunidad que tiene especificidad de unión para IL-17A y comprende una muteína de lipocalina de la invención tal como la lipocalina de SEQ ID NO: 1. En aún algunas realizaciones adicionales, la proteína de fusión comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 y 62.

La proteína de fusión es capaz de unirse a 17A y, en algunas realizaciones preferidas, puede tener un valor de CE50 promedio al menos tan bueno como o superior al valor de CE50 promedio de la muteína de lipocalina tal como se incluye en la proteína de fusión, por ejemplo, cuando la proteína de fusión y la muteína de lipocalina se miden en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 16. En algunos ejemplos, la proteína de fusión es capaz de unirse a IL-23 y en algunos ejemplos preferidos, puede tener un valor de CE50 promedio al menos tan bueno como o superior al valor de CE50 promedio de la muteína de lipocalina tal como se incluye en la proteína de fusión, por ejemplo, cuando la proteína de fusión y la muteína de lipocalina se miden en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 17. En algunas realizaciones, la proteína de fusión es capaz de unirse a TNF- α y, en algunas realizaciones preferidas, puede tener un valor de CE50 promedio al menos tan bueno como o superior al valor de CE50 promedio del anticuerpo tal como se incluye en la proteína de fusión, cuando el anticuerpo y la proteína de fusión se miden en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 18. En algunas realizaciones adicionales, la proteína de fusión puede ser capaz de que unirse a TNF- α , IL-17A e IL-23p19 simultáneamente, por ejemplo, cuando la proteína de fusión se mide en un ensayo esencialmente descrito en el ejemplo 19.

En algunas realizaciones, una proteína de fusión de la divulgación tiene una afinidad de unión por IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) medida mediante una KD de aproximadamente 1 nM o menor. Más preferiblemente, dicha proteína de fusión puede tener una afinidad medida mediante una KD de 0,1 nM o menor. En algunas realizaciones adicionales, el resto (o restos) de unión a IL-17A de una proteína de fusión de la divulgación puede tener una afinidad de unión o capacidad de inhibición para IL-17A (incluyendo IL-17 A/A e IL-17 A/F) tan buena como la de tal resto como polipéptido independiente (véase la tabla 1).

En algunos ejemplos, una proteína de fusión de la divulgación tiene una afinidad de unión por IL-23p19 medida mediante una KD de aproximadamente 10 nM o menor. Más preferiblemente, dicha proteína de fusión puede tener una afinidad medida mediante una KD de aproximadamente 1 nM o menor. En algunos ejemplos adicionales, el resto (o restos) de unión a IL-23p19 de una proteína de fusión de la divulgación puede tener una afinidad de unión o capacidad de inhibición para IL-23p19 tan buena como la de tal resto como polipéptido independiente (véase la tabla 1 a continuación).

Tabla 1: proporciona una visión general de la actividad de muteínas de lipocalinas individuales de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, en comparación con sus proteínas de fusión SEQ ID NO: 3-13 en ensayos de ELISA de competición, resonancia de plasmones superficiales (SPR) y ensayos funcionales basados en células. Se determinaron los valores para la interacción con IL-17 y/o IL-23, dependiendo de si el respectivo constructo contiene la muteína de lipocalina de unión a IL-17A de SEQ ID NO: 1, la muteína de lipocalina de unión a IL-23 de SEQ ID NO: 2, o ambas. Para determinar la actividad hacia IL-17 e IL-23, respectivamente, se llevaron a cabo experimentos de ELISA de competición tal como se describe en el ejemplo 3 y/o el ejemplo 8. Se llevó a cabo un experimento de SPR en formato inverso, es decir, con los constructos proteicos inmovilizados sobre el chip sensor, tal como se describe en el ejemplo 2 y/o en el ejemplo 6, y los ensayos en células se basaron en o bien secreción de G-CSF inducida por IL-17A (ejemplo 5) y/o bien proliferación de células Ba/F3 inducida por IL-23 (ejemplo 10). Obsérvese que el experimento de SPR en formato inverso realizado para determinar la afinidad por IL-23 se llevó a cabo en presencia de concentraciones altas no fisiológicas de NaCl, y que los valores por tanto no reflejan la afinidad por IL-23 en condiciones fisiológicas, pero sirven para determinar si la afinidad relativa por IL-23 es diferente en las proteínas de fusión de SEQ ID NO: 3-13 que

5 contienen SEQ ID NO: 2, en comparación con la muteína individual de SEQ ID NO: 2. La tabla 1 demuestra que la actividad de unión a IL-17A de todas las fusiones que contienen SEQ ID NO: 1 es al menos tan buena como la de SEQ ID NO: 1 en sí misma en todos los formatos de ensayo. SEQ ID NO: 1 puede emplearse por tanto con flexibilidad en cualquier proteína de fusión sin pérdida de actividad. La actividad de unión a IL-23 de todas las fusiones que contienen SEQ ID NO: 2 es muy cercana a la de SEQ ID NO: 2 en sí misma en todos los formatos de ensayo. La SEQ ID NO: 2 puede emplearse por tanto con flexibilidad en cualquier proteína de fusión sin pérdida significativa de actividad.

SEQ ID	ELISA de competición (IC ₅₀ , IL17A)	Biacore, formato inv. (K _D , IL17AF)	Secrecion G-CSF (EC ₅₀ , IL17A)	ELISA de competición (IC ₅₀ , IL23)	Biacore, formato inv. (K _D , IL23)	Prolif. Celular (EC ₅₀ , IL23)
	Ver Ejemplo 3	ver Ejemplo 2	ver Ejemplo 5	Ver Ejemplo 8	ver Ejemplo 7	ver Ejemplo 10
SEQ ID NO: 1	0,08 nM (0,06 - 0,09)	0,10 nM	0,13 nM (0,17/0,1)			
SEQ ID NO: 2				0,54 nM (0,26 - 0,83)	2,9	1,2 nM (1,7/0,7)
SEQ ID NO: 8	0,10 nM (0,07 - 0,13)	0,10 nM				
SEQ ID NO: 7				1,11 nM (0,69 - 1,53)	2,4	
SEQ ID NO: 10	0,05 nM (0,03 - 0,07)	0,04 nM	0,1 nM (0,15/0,04)			
SEQ ID NO: 3	0,04 nM (0,03 - 0,05)	0,10 nM	0,15 nM (0,21/0,09)	0,64 nM (0,49 - 0,79)	3,0	0,9 nM (1,1/0,6)
SEQ ID NO: 4	0,07 nM (0,05 - 0,09)	0,08 nM	0,24 nM (0,20/0,29)	0,99 nM (0,69 - 1,29)	2,0	2,8 nM (2,8/2,7)
SEQ ID NO: 5	0,05 nM (0,03 - 0,06)	0,08 nM	0,15 nM (0,20/0,10)	1,09 nM (0,63 - 1,56)	1,7	n.d.
SEQ ID NO: 9	0,05 nM (0,04 - 0,07)	0,09 nM	0,16 nM (0,19/0,12)	2,07 nM (0,91 - 3,22)	1,9	2,1 nM (2,4/1,7)
SEQ ID NO: 6	0,04 nM (0,02 - 0,05)	0,10 nM	0,05 nM (0,06/0,04)	0,97 nM (0,61 - 1,33)	1,9	0,8 nM (0,9/0,7)
SEQ ID NO: 11	0,09 nM (0,06 - 0,12)	0,07 nM	0,06 ± 0,04 nM (n=3)			
SEQ ID NO: 12	0,03 nM (0,01 - 0,04)	0,04 nM	0,05 ± 0,04 nM (n=3)			
SEQ ID NO: 13	0,04 nM (0,03 - 0,05)	n.d.	0,05 ± 0,04 nM (n=3)			

10 En una realización relacionada, una o más proteínas de fusión de la divulgación son capaces de inhibir la unión de IL-17A a su receptor.

15 En una realización relacionada, una proteína de fusión de la divulgación es capaz de inhibir la unión de IL-23 a su receptor.

20 En algunas realizaciones, una proteína de fusión de la divulgación puede también incluir un ligador (por ejemplo un enlace peptídico) que une covalentemente una muteína de lipocalina de la divulgación y otra muteína de lipocalina de la divulgación entre sí. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante expresión de las muteínas de lipocalinas unidas como un único polipéptido conectado mediante un ligador peptídico. Un ligador peptídico adecuado puede comprender un tramo de aminoácidos de longitud arbitraria que contiene cualesquiera aminoácidos, por ejemplo tal como se describe en el presente documento. Un diseño de ligador preferido utiliza un tramo repetido de aminoácidos de glicinas y serinas según la fórmula (GxSy)_n, en donde x es el número de repeticiones de glicina e y el número de repeticiones de serina en un bloque de construcción que se repite n veces. Los valores de cada una de las variables x, y y n pueden oscilar entre 0 y 100, preferiblemente desde 0 hasta 10. Ejemplos no limitantes se proporcionan en el presente documento con SEQ ID NO: 18-20.

En algunas otras realizaciones, pueden aplicarse métodos químicos de unión covalente para unir una muteína de

lipocalina de la divulgación a otra muteína de lipocalina de la divulgación. Un ejemplo es el uso de ligadores bifuncionales que permiten la reacción química entre el ligador y una cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, entre una maleimida y una cisteína libre en una muteína de lipocalina, o un éster de ácido carboxílico activado y una amina primaria en la muteína de lipocalina. Esto incluye reacción con cadenas laterales de aminoácidos no naturales que pueden incluirse durante la expresión de la proteína, y que proporcionan una funcionalidad que puede derivatizarse selectivamente. En aún algunas realizaciones adicionales, puede usarse química "click", tal como la cicloadición de una azida y un alquino, para unir una o más subunidades de una proteína de fusión de la divulgación.

En algunas realizaciones preferidas adicionales, una proteína de fusión de la divulgación comprende además la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 18-20.

En algunas realizaciones adicionales, una subunidad que comprende una muteína de lipocalina de la divulgación puede unirse, directamente o a través de un ligador químico, a otra subunidad que comprende una muteína de lipocalina de la divulgación en una proteína de fusión como se da a conocer en el presente documento.

En aún algunas realizaciones adicionales, una muteína de lipocalina de la divulgación puede fusionarse a cualquiera de los extremos N- o C-terminales o a ambos extremos N- y C-terminales de otra muteína de lipocalina.

En algunas realizaciones, cada una de las subunidades comprendidas en una proteína de fusión de la divulgación permanece termoestable (por ejemplo puede resistir una temperatura de fusión a una T_f de al menos 40°C). En algunas realizaciones, cada una de dichas tres subunidades, comprendidas en una proteína de fusión de la divulgación, presentan una alta cooperatividad de desplegamiento con respecto a una o más de otras subunidades (por ejemplo eliminan el desplegamiento parcial y reducen así significativamente su tasa de degradación). Esta eliminación del desplegamiento parcial se denomina "cooperativa" porque el desplegamiento es un proceso todo-o-nada. En algunas realizaciones adicionales, una o más muteínas de lipocalinas incluidas en la proteína de fusión pueden resistir una temperatura de fusión a una T_f de al menos 50°C, al menos 55°C, al menos 60°C o incluso mayor. En aún algunas realizaciones adicionales, uno o más componentes de HSA incluidos en la proteína de fusión pueden resistir una temperatura de fusión a una T_f de al menos 30°C, al menos 35°C, al menos 40°C o incluso mayor.

En algunas realizaciones, la una o más proteínas de fusión de la divulgación comprenden multímeros: por ejemplo, tetrámeros, trímeros o dímeros de las muteínas de lipocalinas de la divulgación, en donde al menos una muteína de lipocalina está fusionada a al menos un lado (por ejemplo al extremo N-terminal) de otra muteína de lipocalina. En algunas realizaciones adicionales, pueden preferirse proteínas de fusión multiméricas frente a la correspondiente proteína de fusión monomérica. Por ejemplo, una proteína de fusión dimérica de la divulgación que se une a IL-17A puede presentar una unión más fuerte a IL-17A debido a un efecto de avidéz ocasionado por la naturaleza dimerica de la diana.

En alguna realización adicional, una o más proteínas de fusión de la divulgación dan como resultado la formación de "duocalinas" tal como se describen en Schlehuber, S., y Skerra, A. (2001), Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol. Chem.* 382, 1335-1342.

En aún otro aspecto, la divulgación abarca el uso de una o más proteínas de fusión de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales proteínas para la unión de IL-17A y/o IL-23p19 en un sujeto y/o inhibición de la unión de IL-17 y/o IL-23 a su(s) respectivo(s) receptor(es) en un sujeto.

En aún otro aspecto, la presente divulgación incluye un método de unión de IL-17A y/o IL-23p19 en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una o más proteínas de fusión de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales proteínas.

En aún otro aspecto, la presente divulgación implica un método para inhibir la unión de IL-17 y/o IL-23 a su(s) respectivo(s) receptor(es) en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una o más proteínas de fusión de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales proteínas.

Las proteínas de fusión de la divulgación pueden también incluir una secuencia señal. Las secuencias señal en el extremo N-terminal de un polipéptido dirigen este polipéptido a un compartimento celular específico, por ejemplo el periplasma de *E. coli* o el retículo endoplasmático de células eucariotas. Se conocen en la técnica un gran número de secuencias señal. Una secuencia señal ilustrativa para la secreción de un polipéptido dentro del periplasma de *E. coli* es la secuencia señal OmpA.

La presente divulgación también implica el uso de una o más proteínas de fusión de la divulgación para la formación de complejos con IL-17A y/o IL-23p19.

Por tanto, en otro aspecto de la divulgación, una o más proteínas de fusión de la divulgación pueden usarse para la detección de IL-17A y/o IL-23p19. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más proteínas de fusión de la divulgación, en condiciones adecuadas, con una muestra que se sospecha que contiene IL-17A y/o IL-23p19, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las proteínas e IL-17A y/o entre las proteínas e IL-23p19,

respectivamente, y detectar el complejo mediante una señal adecuada.

La señal detectable puede estar provocada por un marcador, tal como se explicó anteriormente, o por un cambio en propiedades físicas debido a la unión, es decir la formación del complejo, en sí. Un ejemplo es la resonancia de plasmones superficiales, cuyo valor cambia durante la unión de parejas de unión de las cuales una está inmovilizada sobre una superficie tal como una lámina de oro.

La una o más proteínas de fusión dadas a conocer en el presente documento pueden usarse también para la separación de IL-17A y/o IL-23p19 a partir de una muestra que contiene otras sustancias. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas proteínas de fusión, en condiciones adecuadas, con una muestra que se supone que contiene IL-17A y/o IL-23p19, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las proteínas e IL-17A y/o entre las proteínas e IL-23, respectivamente, y separar el complejo de la muestra.

En el uso de las proteínas de fusión dadas a conocer para la detección de IL-17A y/o IL-23p19 así como para la separación de IL-17A y/o IL-23p19, la proteína de fusión, IL-17A, IL-23p19 y/o un dominio o fragmento de la misma pueden estar inmovilizados sobre una fase sólida adecuada.

Por consiguiente, puede determinarse la presencia o ausencia de moléculas tales como IL-17A y/o IL-23p19, por ejemplo, en una muestra, así como su concentración o nivel.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit que comprende al menos una proteína de fusión de la divulgación y una o más instrucciones para utilizar el kit.

En algunos ejemplos, el kit incluye además integralmente al mismo o como uno o más documentos separados, información referente a los contenidos del kit y el uso de las proteínas de fusión. El kit puede incluir en algunos ejemplos una o más proteínas de fusión de la divulgación que están formuladas para su reconstitución en un diluyente. Un diluyente de este tipo, por ejemplo un diluyente estéril, puede también estar incluido en el kit, por ejemplo dentro de un recipiente.

En algunas realizaciones, la una o más proteínas de fusión de la invención pueden ser usadas en el tratamiento de varios estados en donde se desea la supresión de la respuesta inmunitaria, tales como artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis en placas y artritis idiopática juvenil.

E. Muteínas de lipocalinas y proteínas de fusión de la divulgación

Las lipocalinas son moléculas de unión proteínicas que han evolucionado de manera natural para unirse a ligandos. Las lipocalinas existen en muchos organismos, incluyendo vertebrados, insectos, plantas y bacterias. Los miembros de la familia de proteínas lipocalinas (Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) *FASEB J.* 1, 209-214) son normalmente proteínas secretadas, pequeñas y tienen una única cadena polipeptídica. Se caracterizan por una gama de diferentes propiedades de reconocimiento molecular: su capacidad de unirse a diversas moléculas, principalmente hidrófobas (tales como retinoides, ácidos grasos, colesterol, prostaglandinas, biliverdinas, feromonas, saborizantes y aromatizantes), su unión a receptores específicos en la superficie celular y su formación de complejos macromoleculares. Aunque en el pasado se han clasificada principalmente como proteínas de transporte, ahora está claro que las lipocalinas cumplen una variedad de funciones fisiológicas. Estas incluyen papeles en el transporte de retinol, olfato, señalización de feromonas y síntesis de prostaglandinas. Las lipocalinas se han implicado también en la regulación de la respuesta inmunitaria y la mediación de la homeostasis celular (revisado, por ejemplo, en Flower, D.R. (1996) *Biochem. J.* 318, 1-14 y Flower, D.R. *et al.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24).

Las lipocalinas comparten niveles inusualmente bajos de conservación de secuencia global, a menudo con identidades de secuencia de menos del 20%. En fuerte contraste, su patrón de plegamiento global está altamente conservado. La parte central de la estructura de lipocalina consiste en una única hoja β anti-paralela de ocho hebras, cerrada sobre sí misma para formar un barril β unido por puentes de hidrógeno de manera continua. Este barril β forma una cavidad central. Un extremo del barril está estéricamente bloqueado por el segmento peptídico N-terminal que discurre a través de su parte inferior así como tres bucles peptídicos que conectan las hebras β . El otro extremo del barril β está abierto al disolvente y abarca un sitio de unión a diana, el cual está formado por cuatro bucles peptídicos flexibles. Es esta diversidad de bucles en el armazón de lipocalina por lo demás rígido lo que da origen a una variedad de diferentes modos de unión cada uno capaz de acomodar dianas de diferentes tamaño, forma y carácter químico (revisado, por ejemplo en Flower, D.R. (1996), citado anteriormente; Flower, D.R. *et al.* (2000), citado anteriormente, o Skerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350).

Una muteína de lipocalina según la presente divulgación puede ser una muteína de cualquier lipocalina elegida. Ejemplos de lipocalinas adecuadas (también denominadas a veces como "armazones 'de referencia' proteicos" o simplemente "armazones") de los cuales puede usarse una muteína, incluyen, pero no se limitan a, lipocalina lagrimal (lipocalina-1, proteína de glándulas de von Ebner), proteína de unión a retinol, prostaglandina D-sintasa de tipo lipocalina, neutrófila, β -lactoglobulina, proteína de unión a bilina (BBP), apolipoproteína D (APO D), lipocalina asociada

a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), lipocalina lagrimal (Tlc), proteína relacionada con α 2-microglobulina (A2m), 24p3/uterocalina (24p3), proteína 1 de glándulas de von Ebner (VEGP 1), proteína 2 de glándulas de von Ebner (VEGP 2) y precursor de alérgeno mayor Can f1 (ALL-1). En ejemplos relacionados, la muteína de lipocalina se selecciona del grupo que consiste en lipocalina humana asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), lipocalina lagrimal humana (Tlc), apolipoproteína D (APO D) humana y la proteína de unión a bilina de *Pieris brassicae*.

Cuando se usa en el presente documento en el contexto de las muteínas de lipocalinas de la presente divulgación que se unen a IL-17A o IL-23p19, el término "específica para" incluye que la muteína de lipocalina está dirigida contra, se une a, o reacciona con IL-17A o IL-23p19, respectivamente. Así, que está dirigida a, que se une a, o que reacciona con, incluye que la muteína de lipocalina se une específicamente a IL-17A o IL-23p19, respectivamente. El término "específicamente" en este contexto significa que la muteína de lipocalina reacciona con una proteína IL-17A o con una proteína IL-23p19, tal como se describe en el presente documento, pero esencialmente no con otra proteína. El término "otra proteína" incluye cualquier proteína distinta de IL-17A o distinta de IL-23p19, respectivamente, incluyendo proteínas estrechamente relacionadas o que son homólogas a IL-17A o IL-23p19 contra las cuales están dirigidas las lipocalinas dadas a conocer en el presente documento. Sin embargo, las proteínas IL-17A o IL-23p19, fragmentos y/o variantes de especies distintas de la humana tal como las descritas en el contexto de la definición de "sujeto" no están excluidas por el término "otra proteína". La expresión "no se une esencialmente" significa que la muteína de lipocalina de la presente divulgación no se une a otra proteína, es decir muestra una reactividad cruzada de menos del 30%, preferiblemente el 20%, más preferiblemente el 10%, en particular preferiblemente menos del 9, 8, 7, 6 o 5%. Si la lipocalina reacciona específicamente tal como se define en el presente documento puede someterse a prueba fácilmente, entre otros, comparando la reacción de una muteína de lipocalina de la presente divulgación con IL-17A o IL-23p19 y la reacción de dicha lipocalina con otra(s) proteína(s). También puede determinarse la "unión específica", por ejemplo, según inmunoensayos de tipo Western, pruebas de ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC y exploraciones de péptidos.

La secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina según la divulgación tiene una alta identidad de secuencia con la respectiva lipocalina en comparación con identidades de secuencia con otra lipocalina (véase también anteriormente). En este contexto general la secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina de la combinación según la divulgación es al menos sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de la correspondiente lipocalina (la lipocalina silvestre o de referencia). Una respectiva secuencia de una muteína de lipocalina de la combinación según la divulgación, que es sustancialmente similar a las secuencias de la lipocalina correspondiente, tiene respecto de la lipocalina silvestre (o referencia), en uno o más ejemplos de aminoácidos, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 82%, al menos el 85%, al menos el 87%, al menos el 90% de identidad, incluyendo al menos el 95% de identidad con la secuencia de la correspondiente lipocalina. En este sentido, una muteína de lipocalina de la divulgación, por supuesto, puede contener, en comparación sustituciones tal como se describe en el presente documento que hacen a la muteína de lipocalina capaz de unirse a IL-17A o IL-23p19, respectivamente. Normalmente, una muteína de una lipocalina incluye una o más mutaciones (en relación a la lipocalina de secuencia nativa) de aminoácidos en los cuatro bucles en el extremo abierto del sitio de unión a ligando de la lipocalina (véase anteriormente). Tal como se explicó anteriormente, estas regiones son esenciales para determinar la especificidad de unión de una muteína de lipocalina por una diana deseada. Como ejemplo ilustrativo, una muteína derivada de un polipéptido de lipocalina lagrimal, lipocalina de NGAL o un homólogo de la misma, puede tener uno, dos, tres, cuatro o más residuos de aminoácidos mutados en cualquier posición de secuencia en la región N-terminal y/o en los tres bucles peptídicos BC, DE y FG dispuestos en el extremo de la estructura de barril β que está situado opuesto al bolsillo de unión de la lipocalina natural. Como ejemplo ilustrativo adicional, una muteína derivada de un polipéptido de lipocalina lagrimal o un homólogo de la misma, puede no tener residuos de aminoácidos mutados en el bucle peptídico DE dispuesto en el extremo de la estructura de barril β , en comparación con la secuencia silvestre de la lipocalina lagrimal.

Una muteína de lipocalina según la divulgación incluye una o más, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o incluso veinte sustituciones en comparación con la correspondiente lipocalina nativa, siempre que una muteína de lipocalina de este tipo sea capaz de unirse a IL-17A o IL-23p19, respectivamente. Por ejemplo, una muteína de lipocalina puede tener una sustitución en una posición correspondiente a una posición distinta (es decir, en una posición correspondiente) de la lipocalina silvestre que tiene la secuencia silvestre de, por ejemplo, la lipocalina lagrimal, lipocalina NGAL, o cualquier otra lipocalina dada a conocer en el presente documento. En algunos ejemplos una muteína de lipocalina de la combinación según la divulgación incluye al menos dos sustituciones de aminoácidos, incluyendo 2, 3, 4 o 5, a veces incluso más, sustituciones de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de arginina. Por consiguiente, el ácido nucleico de un armazón de 'referencia' proteico tal como se describe en el presente documento se somete a mutagénesis con el objeto de generar una muteína de lipocalina que sea capaz de unirse a IL-17A o IL-23p19, respectivamente.

Además, una muteína de lipocalina de la presente divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos heteróloga en su extremo N-terminal o C-terminal, preferiblemente C-terminal, tal como una etiqueta Strep, por ejemplo, etiqueta Strep II sin afectar a la actividad biológica (unión a su diana por ejemplo IL-17A o IL-23p19, respectivamente) de la muteína de lipocalina. Un ejemplo preferido de una etiqueta se muestra en SEQ ID NO: 17).

De manera similar, una muteína de lipocalina de la presente divulgación puede carecer de 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos en su extremo N-terminal y/o 1, 2 o más aminoácidos en su extremo C-terminal, en comparación con la respectiva lipocalina silvestre; por ejemplo, SEQ ID NO: 2-7 y 12-14.

5 Específicamente, con el objeto de determinar si un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina diferente de una lipocalina silvestre corresponde a una cierta posición en la secuencia de aminoácidos de una lipocalina silvestre, un experto en la técnica puede usar medios y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo alineaciones, ya sea manualmente o usando programas informáticos tales como BLAST2.0, que significa Basic Local Alignment Search Tool o ClustalW o cualquier otro programa adecuado que sea adecuado para
10 generar alineaciones de secuencias. Por consiguiente, una lipocalina silvestre puede servir como “secuencia sujeto” o “secuencia de referencia”, mientras que la secuencia de aminoácidos de una lipocalina diferente de la lipocalina silvestre descrita en el presente documento sirve como “secuencia de consulta”. Los términos “secuencia de referencia” y “secuencia silvestre” se usan indistintamente en el presente documento.

15 En algunos ejemplos, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, se contempla cualquier sustitución, incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones a modo de ejemplo enumeradas a continuación, siempre que la muteína de lipocalina retenga su capacidad de unirse a IL-17A o IL-23p19, respectivamente, y/o tenga una identidad con la secuencia entonces sustituida que es al menos el 60%, tal como al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% o más idéntica a la secuencia
20 “original”.

Las sustituciones conservativas son generalmente las siguientes sustituciones, enumeradas según el aminoácido que va a mutarse, seguido cada uno por uno o más reemplazos que pueden considerarse conservativos: Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu. Otras sustituciones también son permisibles y pueden determinarse empíricamente o según otras sustituciones conservativas o no conservativas. Como orientación adicional, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que puede considerarse normalmente que definen
25 sustituciones conservativas entre sí:

- 30
- a. Alanina (Ala), Glicina (Gly);
 - b. Acido aspártico (Asp), Acido glutámico (Glu);
 - 35 c. Asparagina (Asn), Glutamina (Gln);
 - d. Arginina (Arg), Lisina (Lys);
 - e. Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Metionina (Met), Valina (Val);
 - 40 f. Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr), Triptofano (Trp);
 - g. Serina (Ser), Treonina (Thr); y
 - 45 h. Cisteína (Cys), Metionina (Met)

Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, tales como los siguientes, o tal como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y los productos pueden examinarse para detectar una característica deseada. Ejemplos de cambios más sustanciales son: Ala → Leu, Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, Norleucina; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala.

55 Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de la lipocalina seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se producen de manera natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: norleucina, metionina, alanina, valina, leucina, iso-leucina; (2) hidrófilos neutros: cisteína, serina, treonina; (3) ácidos: ácido aspártico, ácido glutámico; (4) básicos: asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: glicina, prolina; y (6) aromáticos: triptofano, tirosina, fenilalanina.

Las sustituciones no conservativas supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada de la respectiva lipocalina también puede sustituirse, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. De modo inverso, pueden añadirse enlace(s) de cisteína a la lipocalina para mejorar su
65

estabilidad.

Cualquier mutación, incluyendo una inserción tal como se comentó anteriormente, puede lograrse muy fácilmente sobre el ácido nucleico, por ejemplo a nivel del ADN usando métodos convencionales establecidos. Ejemplos ilustrativos de alteraciones de la secuencia de aminoácidos son inserciones o deleciones así como sustituciones de aminoácidos. Tales sustituciones pueden ser conservativas, es decir un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido de propiedades químicas similares, en particular con respecto a polaridad así como tamaño. Ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre los miembros de los siguientes grupos: 1) alanina, serina y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) iso-leucina, leucina, metionina y valina; y 6) fenilalanina, tirosina y triptofano. Por otro lado, también es posible introducir alteraciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos. Además, en lugar de reemplazar residuos de aminoácidos individuales, también es posible insertar o eliminar uno o más aminoácidos continuos de la estructura primaria de la lipocalina lagrimal siempre que estas deleciones o inserciones den como resultado una muteína funcional/plegada estable.

Las modificaciones de la secuencia de aminoácidos incluyen mutagénesis dirigida de posiciones de aminoácidos individuales con el objeto de simplificar la subclonación del gen de lipocalina mutado o de sus partes incorporando sitios de escisión para ciertas enzimas de restricción. Además, estas mutaciones pueden también incorporarse para mejorar adicionalmente la afinidad de una muteína de lipocalina o una proteína de fusión por una diana dada. Adicionalmente, pueden introducirse mutaciones con el objeto de modular ciertas características de la muteína o proteína de fusión tal como mejorar la estabilidad de plegamiento, estabilidad en suero, resistencia de la proteína o solubilidad en agua o para reducir la tendencia a la agregación, si es necesario. Por ejemplo, residuos de cisteína que se producen de manera natural pueden mutarse a otros aminoácidos para prevenir la formación de puentes disulfuro. También es posible mutar deliberadamente otras posiciones de la secuencia de aminoácidos a cisteína con el objeto de introducir nuevos grupos reactivos, por ejemplo para la conjugación con otros compuestos, tales como polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), biotina, péptidos o proteínas, o para la formación de puentes disulfuro que no se producen de manera natural. El resto tiol generado pueden usarse para PEGilar o HESilar la muteína o la proteína de fusión, por ejemplo, con el objeto de aumentar la semivida en suero de una respectiva muteína de lipocalina o proteína de fusión.

En algunas realizaciones, si uno de los restos anteriores está conjugado con una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la divulgación, puede ser ventajosa la conjugación con una cadena lateral de aminoácido. Las cadenas laterales de aminoácidos adecuadas pueden producirse de manera natural en la secuencia de aminoácidos de una lipocalina humana o pueden introducirse mediante mutagénesis. En caso que se introduzca por medio de mutagénesis un sitio de unión adecuado, una posibilidad es el reemplazo de un aminoácido en la posición apropiada por un residuo de cisteína.

Por ejemplo, tal mutación incluye al menos una sustitución de Thr 40→ Cys, Glu 73→ Cys, Arg 90→ Cys, Asp 95→ Cys o Glu 131→ Cys en la secuencia silvestre de lipocalina lagrimal humana. El nuevo residuo de cisteína creado en cualquiera de estas posiciones puede en un futuro utilizarse para conjugar la muteína o la proteína de fusión con un resto que prolonga la semivida en suero de la muteína o una proteína de fusión de la misma, tal como PEG o un derivado activado del mismo.

Con respecto a una muteína de lipocalina 2 humana, las posibilidades a modo de ejemplo de una mutación de este tipo para introducir un residuo de cisteína dentro de la secuencia de aminoácidos de una lipocalina incluyendo muteína de lipocalina 2 humana incluyen la introducción de un residuo de cisteína (Cys) en al menos una de las posiciones de secuencia que corresponden a las posiciones de secuencia 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 o 158 de la secuencia silvestre de NGAL humana. En algunos ejemplos en donde una muteína de lipocalina 2 humana de la divulgación tiene una secuencia en la cual, en comparación con la secuencia del número de registro de SWISS-PROT/UniProt Data Bank P80188, una cisteína se ha reemplazado por otro residuo de aminoácido, la cisteína correspondiente puede reintroducirse en la secuencia. Como ejemplo ilustrativo, un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 87 puede introducirse en tal caso revirtiendo a una cisteína tal como estaba originalmente presente en la secuencia del número de registro de SWISS-PROT P80188. El resto tiol generado en el lateral de cualquier de las posiciones de aminoácidos 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 y/o 158 puede usarse para PEGilar o HESilar la muteína, por ejemplo, con el objeto de aumentar la semivida en suero de una respectiva muteína de lipocalina 2 humana o una proteína de fusión de la misma.

En otro ejemplo, con el objeto de proporcionar cadenas laterales de aminoácidos adecuadas para conjugar uno de los restos anteriores a una muteína de lipocalina o una proteína de fusión según la presente divulgación, pueden introducirse aminoácidos artificiales mediante mutagénesis. Generalmente, tales aminoácidos artificiales están diseñados para ser más reactivos y así facilitar la conjugación al compuesto deseado. Un ejemplo de tales aminoácidos artificiales que pueden introducirse mediante un ARNt artificial es para-acetil-fenilalanina.

Para varias aplicaciones de las muteínas o proteínas de fusión dadas a conocer en el presente documento, puede ser ventajoso usarlas en forma de conjugados, por ejemplo, fusionadas con un resto que es una proteína, un dominio proteico o un péptido. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la misma está

fusionada en el extremo N-terminal o C-terminal de la muteína de lipocalina (incluyendo tal como está comprendida en una proteína de fusión de la divulgación) a una proteína, un domino proteico o un péptido, por ejemplo, una secuencia señal y/o etiqueta de afinidad.

5 Etiquetas de afinidad tales como Strep-tag® o Strep-tag® II (Schmidt, T.G.M. *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766), etiqueta myc, etiqueta FLAG, etiqueta His₆ o etiqueta HA o proteínas tales como glutatión-S-transferasa que también permiten la fácil detección y/o purificación de proteínas recombinantes, son ejemplos adicionales de parejas de fusión adecuadas. Finalmente, proteínas con propiedades cromogénicas o fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde (GFP) o la proteína fluorescente amarilla (YFP) son también parejas de fusión adecuadas para las muteínas de lipocalinas de la divulgación.

10 En general, es posible marcar las muteínas de lipocalinas o proteínas de fusión de la divulgación con un compuesto que incluye cualquier sustancia química o enzima apropiadas, lo cual genera directamente o indirectamente un compuesto o señal detectables en una reacción química, física, óptica o enzimática. Un ejemplo de una reacción física y al mismo tiempo reacción/marcador óptico es la emisión de fluorescencia tras la irradiación o la emisión de rayos X cuando se usa un marcador radioactivo. La fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y β -galactosidasa son ejemplos de marcadores enzimáticos (y al mismo tiempo marcadores ópticos) que catalizan la formación de productos de reacción cromogénicos. En general, todas los marcadores comúnmente usados para anticuerpos (excepto aquellos usados exclusivamente con el resto azúcar en la parte Fc de inmunoglobulinas) pueden usarse también para conjugación a las muteínas de lipocalinas o proteínas de fusión de la divulgación. Las muteínas de lipocalinas o proteínas de fusión de la divulgación también pueden estar conjugadas con cualquier agente terapéuticamente activo adecuado, por ejemplo para el suministro dirigido de tales agentes a células, tejidos u órganos dados o para la selección como diana selectiva de células, por ejemplo células tumorales sin afectar las células normales circundantes. Ejemplos de tales agentes terapéuticamente activos incluyen radionúclidos, toxinas, moléculas orgánicas pequeñas y péptidos terapéuticos (tal es como péptidos que actúan como agonistas/antagonistas de un receptor de superficie celular o péptidos que compiten por un sitio de unión a proteína en una diana celular dada). Las muteínas de lipocalinas o proteínas de fusión de la divulgación, sin embargo, pueden estar conjugadas también con ácidos nucleicos terapéuticamente activos tales como moléculas de ácido nucleico antisentido, ARN de interferencia pequeños, micro ARN o ribozimas. Tales conjugados pueden producirse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

15 Tal como se indicó anteriormente, una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la divulgación puede en algunas realizaciones estar conjugada con un resto que extiende la semivida en suero de la muteína o de la proteína de fusión (en este sentido véase también la publicación PCT WO 2006/56464 donde se describen tales estrategias de conjugación con referencias a muteínas de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos humana con afinidad de unión por CTLA-4). El resto que extiende la semivida en suero puede ser una molécula de polialquilenglicol, hidroxietilalmidón, moléculas de ácido graso, tales como ácido palmítico (Vajo & Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9), una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un dominio de unión a albúmina, un péptido de unión a albúmina o una proteína de unión a albúmina, transferrina para nombrar sólo unos pocos. La proteína de unión a albúmina puede ser una proteína de unión a albúmina bacteriana, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que incluye anticuerpos de dominio (véase la patente estadounidense 6.696.245, por ejemplo), o una muteína de lipocalina con actividad de unión para albúmina. Por consiguiente, una pareja de conjugación adecuado para extender la semivida de una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la divulgación incluye un dominio de unión a albúmina bacteriano, tal como el de la proteína G de estreptococos (König, T., & Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83) o el mostrado en SEQ ID NO: 39. Además, ejemplos de péptidos de unión a albúmina que pueden usarse como parejas de conjugación son, por ejemplo aquellos que tienen una secuencia consenso Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, en donde Xaa₁ es Asp, Asn, Ser, Thr o Trp; Xaa₂ es Asn, Gln, His, Ile, Leu o Lys; Xaa₃ es Ala, Asp, Phe, Trp o Tyr; y Xaa₄ es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser o Thr tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense 2003/0069395 o Dennis *et al.* (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043).

20 En otras realizaciones, la albúmina en sí misma (Osborn, B.L. *et al.*, 2002, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548), o un fragmento biológicamente activo de albúmina puede usarse como pareja de conjugación de una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la divulgación. El término "albúmina" incluye todas las albúminas de mamífero tales como albúmina sérica humana o albúmina sérica bovina o albúmina de rata.

25 Si la proteína de unión a albúmina es un fragmento de anticuerpo éste puede ser un anticuerpo de dominio. Los anticuerpo de dominio (dAb) están modificados por ingeniería genética para permitir un control preciso sobre propiedades biofísicas y semivida *in vivo* para crear el perfil óptimo de seguridad y eficacia del producto. Anticuerpos de dominio están por ejemplo disponibles comercialmente a partir de Domantis Ltd. (Cambridge, RU y MA, EE.UU.).

30 Cuando se usa transferrina como resto para extender la semivida en suero de las muteínas de lipocalina o de las proteínas de fusión de la divulgación, las muteínas o las proteínas de fusión pueden fusionarse genéticamente al extremo N- o C-terminal, o ambos, de transferrina no glicosilada. La transferrina no glicosilada tiene una semivida de 14-17 días, y una muteína o proteína de fusión conjugada con transferrina tendrá de manera similar una semivida extendida. El portador transferrina también proporciona alta biodisponibilidad, biodistribución y estabilidad en circulación. Esta tecnología está comercialmente disponible de BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA,

EE.UU.). La transferrina recombinante humana (DeltaFerrin™) para uso como proteína estabilizadora/pareja de extensión de la semivida, también está comercialmente disponible de Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, RU).

Si una parte Fc de una inmunoglobulina se usa con el propósito de prolongar la semivida en suero de las muteínas de lipocalina o de las proteínas de fusión de la divulgación, puede usarse la tecnología SynFusion™, comercialmente disponible a de Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, EE.UU.). El uso de esta tecnología de fusión a Fc permite la creación de productos biofarmacéuticos de actuación más prolongada y puede, por ejemplo, consistir en dos copias de una muteína unida a la región Fc de un anticuerpo para mejorar la farmacocinética, solubilidad y eficiencia de producción.

Aún otra alternativa para prolongar la semivida de las muteínas de lipocalina o de las proteínas de fusión de la divulgación es fusionar al extremo N- o C-terminal de las muteínas (incluyendo las comprendidas en proteínas de fusión de la divulgación) secuencias ricas en glicina, flexibles, no estructuradas, largas (por ejemplo, poli-glicina con de aproximadamente 20 a 80 residuos de glicina consecutivos). Este enfoque dado a conocer en el documento WO 2007/038619, por ejemplo, también se ha denominado "PEGr" (PEG recombinante).

Si se usa polialquilenglicol como pareja de conjugación, el polialquilenglicol puede estar sustituido, no sustituido, ser lineal o ramificado. También puede ser un derivado de polialquileño activado. Ejemplos de compuestos adecuados son moléculas de polietilenglicol (PEG) tal como se describen en el documento WO 99/64016, en la patente estadounidense 6.177.074 o en la patente estadounidense 6.403.564 en relación con interferón, o tal como se describe para otras proteínas tales como asparaginasa modificada con PEG, PEG-adenosina desaminasa (PEG-ADA), PEG-superóxido dismutasa (véase por ejemplo, Fuertges *et al.* (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins, J. Control. Release 11, 139-148). El peso molecular de un polímero de este tipo, tal como polietilenglicol, puede oscilar entre aproximadamente 300 y aproximadamente 70.000 Dalton, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol con un peso molecular de aproximadamente 10.000, de aproximadamente 20.000, de aproximadamente 30.000 o de aproximadamente 40.000 Dalton. Más aún, tal como se describe por ejemplo en las patentes estadounidenses 6.500.930 o 6.620.413, oligómeros y polímeros de hidratos de carbono tales como almidón o hidroxietilalmidón (HES) pueden conjugarse con una muteína o una proteína de fusión de la divulgación con el propósito de extensión de la semivida en suero.

Además, una muteína de lipocalina o proteína de fusión dada a conocer en el presente documento puede conjugarse con un resto que puede conferir nuevas características a las muteínas de lipocalina o proteínas de fusión de la divulgación tal como actividad enzimática o afinidad de unión por otras moléculas. Los ejemplos de restos adecuados incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glutatión-S-transferasa, el dominio de unión a albúmina de proteína G, proteína A, fragmentos de anticuerpos, dominios de oligomerización o toxinas.

Además, puede ser posible fusionar una muteína de lipocalina o proteína de fusión dada a conocer en el presente documento con un sitio activo de enzima separado de modo que ambos "componentes" de la proteína de fusión resultante en conjunto actúen sobre una diana terapéutica dada. Por ejemplo, el dominio de unión de la muteína de lipocalina (incluyendo tal como está comprendida en una proteína de fusión de la divulgación) puede unirse a la diana causante de la enfermedad, permitiendo que el dominio enzimático suprima la función biológica de la diana.

En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la divulgación puede conjugarse con un resto mediante un ligador (por ejemplo un ligador peptídico) que une covalentemente una muteína de lipocalina de la divulgación y otro resto dado a conocer entre sí. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la expresión de las muteínas de lipocalina unidas como un único polipéptido conectado mediante un ligador peptídico. Un ligador peptídico adecuado puede comprender un tramo de aminoácidos de longitud arbitraria que contiene cualesquiera aminoácidos. Un diseño de ligador preferido utiliza un tramo repetido de aminoácidos de glicinas y serinas según la fórmula (GxSy)_n, en donde x es el número de repeticiones de glicina e y el número de repeticiones de serina en un bloque de construcción que se repite n veces. Los valores de cada una de las variables x, y y n pueden estar en el intervalo de desde 0 hasta 100, preferiblemente desde 0 hasta 10. Se proporcionan por el presente documento ejemplos no limitantes con SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 36-38.

En algunas otras realizaciones, pueden aplicarse métodos químicos de unión covalente para unir una muteína de lipocalina de la divulgación a otro resto dado a conocer. Un ejemplo es el uso de ligadores bifuncionales que permiten la reacción química entre el ligador y una cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, entre una maleimida y una cisteína libre en una muteína de lipocalina, o un éster de ácido carboxílico activado y una amina primaria en la muteína de lipocalina. Esto incluye reacción con cadenas laterales de aminoácidos no naturales que pueden incluirse durante la expresión de la proteína, y que proporcionan una funcionalidad que puede derivatizarse selectivamente. En aún algunas realizaciones adicionales, puede usarse química "click", tal como la cicloadición de una azida y un alquino para unir una o más subunidades de una proteína de fusión de la divulgación.

La presente divulgación también se refiere a moléculas de ácido nucleico (ADN y ARN) que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para las muteínas de lipocalina y las proteínas de fusión de la divulgación. Ya que la degeneración del código genético permite sustituciones de ciertos codones por otros codones que especifican el mismo aminoácido, la divulgación no está limitada a una molécula de ácido nucleico específica que codifica para una

5 muteína de lipocalina o una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento sino que abarca todas las moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para una muteína funcional o una proteína de fusión funcional. En este sentido, la presente divulgación proporciona secuencias de nucleótidos que codifican para algunas muteínas de lipocalina a modo de ejemplo, algunas proteínas de fusión genéricas a modo de ejemplo tal como se muestran en SEQ ID NO: 23-35, 45-49 y 54.

10 En un ejemplo de la divulgación, el método incluye someter la molécula de ácido nucleico a mutagénesis en los tripletes de nucleótidos que codifican para al menos una, a veces incluso más, de las posiciones de secuencia que corresponden a las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de NGAL humana (SEQ ID NO: 8).

15 En otro ejemplo del método según la divulgación, una molécula de ácido nucleico que codifica para una lipocalina lagrimal humana se somete en primer lugar a mutagénesis en una o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 26-34, 55-58, 60-61, 64, 104-108 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana (SEQ ID NO: 1). En segundo lugar, la molécula de ácido nucleico que codifica para una lipocalina lagrimal humana se somete también a mutagénesis en una o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 101, 111, 114 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lagrimal humana madura.

20 La divulgación también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican para las muteínas de lipocalina y proteínas de fusión de la divulgación, las cuales incluyen mutaciones adicionales fuera de las posiciones de secuencia indicadas de mutagénesis experimental. Tales mutaciones se toleran a menudo o pueden incluso demostrar ser ventajosas, por ejemplo si contribuyen a una eficiencia de plegamiento, estabilidad en suero, estabilidad térmica o afinidad de unión a ligando mejoradas de las muteínas o de las proteínas de fusión.

25 Una molécula de ácido nucleico dada a conocer en esta solicitud puede estar "operativamente unida" a una secuencia regulatoria (o secuencias regulatorias) para permitir la expresión de esta molécula de ácido nucleico.

30 Una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, se le refiere como "capaz de expresar una molécula de ácido nucleico" o capaz "de permitir la expresión de una secuencia de nucleótidos" si incluye elementos de secuencia que contienen información respecto a la regulación transcripcional y/o traduccional, y tales secuencias están "operativamente unidas" a la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido. Una unión operativa es una unión en la cual los elementos de secuencia regulatoria y la secuencia que va a expresarse están conectados de un modo que permite la expresión génica. La naturaleza precisa de las regiones regulatorias necesarias para la expresión génica puede variar entre especies, pero en general estas regiones incluyen un promotor que, en procariotas, contiene tanto el promotor *per se*, es decir elementos de ADN que dirigen el inicio de la transcripción, así como elementos de ADN que, cuando se transcriben a ARN, señalarán el inicio de la traducción. Tales regiones promotoras incluyen normalmente secuencias no codificantes en 5' implicadas en el inicio de la transcripción y traducción, tales como las cajas -35/-10 y el elemento de Shine-Dalgarno en procariotas o la caja TATA, secuencias CAAT y elementos de caperuza en 5' en eucariotas. Estas regiones también pueden incluir elementos potenciadores o represores así como secuencias señal y líder traducidas para dirigir el polipéptido nativo hacia un compartimento específico de una célula huésped.

45 Además, las secuencias no codificantes en 3' pueden contener elementos regulatorios implicados en la terminación transcripcional, poliadenilación, o similar. Si, sin embargo, estas secuencias de terminación no son satisfactoriamente funcionales en una célula huésped particular, entonces pueden sustituirse con señales funcionales en esa célula.

50 Por tanto, una molécula de ácido nucleico de la divulgación puede incluir una secuencia regulatoria, tal como una secuencia promotora. En algunas realizaciones una molécula de ácido nucleico de la divulgación incluye una secuencia promotora y una secuencia de terminación de la transcripción. Promotores procariotas adecuados son por ejemplo, el promotor tet, el promotor lacUV5 o el promotor T7. Ejemplos de promotores útiles para la expresión en células eucariotas son el promotor de SV40 o el promotor de CMV.

55 Las moléculas de ácido nucleico de la divulgación también pueden ser parte de un vector o cualquier otra clase de vehículo de clonación, tal como un plásmido, un fagémido, un fago, un baculovirus, un cósmido o un cromosoma artificial.

60 En una realización, la molécula de ácido nucleico está incluida en un fásmido. Un vector de fásmido indica un vector que codifica para la región intergénica de un fago temperado, tal como M13 o f1, o una parte funcional del mismo fusionada con el ADNc de interés. Después de la superinfección de las células huésped bacterianas con un vector de fagémido de este tipo y un fago auxiliar apropiado (por ejemplo M13K07, VCS-M13 o R408), se producen partículas de fago intactas, permitiendo de ese modo el acoplamiento físico del ADNc heterólogo codificado a su correspondiente polipéptido presentado en la superficie del fago (véanse por ejemplo Lowman, H.B. (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401-424, o Rodi, D.J., y Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93).

65 Tales vehículos de clonación pueden incluir, aparte de las secuencias regulatorias descritas anteriormente y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una muteína de lipocalina o una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento, secuencias de replicación y control derivadas de una especie compatible con la célula

huésped que se usa para la expresión así como marcadores de selección que confieren un fenotipo seleccionable en células transformadas o transfectadas. Se conocen grandes números de vectores de clonación en la técnica y están comercialmente disponibles.

5 La molécula de ADN que codifica para una muteína de lipocalina o una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento, y en particular un vector de clonación que contiene la secuencia codificante de una muteína de este tipo puede transformarse en una célula huésped capaz de expresar el gen. La transformación puede realizarse usando técnicas convencionales. Así, la divulgación también está dirigida a una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico dada a conocer en el presente documento.

10 Las células huésped transformadas se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la divulgación. Las células huésped adecuadas pueden ser procariontas, tales como *Escherichia coli* (*E. coli*) o *Bacillus subtilis*, o eucariotas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, células de insecto SF9 o High5, líneas celulares de mamífero inmortalizadas (por ejemplo, células HeLa o células CHO) o células de mamífero primarias.

15 La divulgación también se refiere a un método para la producción de un polipéptido tal como se describe en el presente documento, en donde la muteína de lipocalina o la proteína de fusión se produce partiendo del ácido nucleico que codifica para la muteína de lipocalina o la proteína de fusión mediante métodos de ingeniería genética. El método puede llevarse a cabo *in vivo*, la muteína de lipocalina o la proteína de fusión pueden producirse por ejemplo en un organismo huésped bacteriano o eucariota y luego aislarse de este organismo huésped o su cultivo. También es posible producir una proteína *in vitro*, por ejemplo mediante el uso un sistema de traducción *in vitro*.

20 Cuando se produce la muteína de lipocalina, la proteína de fusión o el fragmento *in vivo*, un ácido nucleico que codifica para dicha muteína se introduce dentro de un organismo huésped bacteriano o eucariota mediante la tecnología de ADN recombinante (tal como ya explicó de manera resumida anteriormente). Con este propósito, la célula huésped se transforma en primer lugar con un vector de clonación que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica para una muteína de lipocalina o una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento usando métodos convencionales establecidos. La célula huésped se cultiva entonces en condiciones que permiten la expresión del ADN heterólogo y así la síntesis del correspondiente polipéptido. Posteriormente, el polipéptido se recupera o bien de la célula o bien del medio de cultivo.

25 En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, dada a conocer en esta solicitud puede estar "operativamente unida" a otra molécula de ácido nucleico de la divulgación para permitir la expresión de una proteína de fusión de la divulgación. En este sentido, una unión operativa es una unión en la cual los elementos de secuencia de la primera molécula de ácido nucleico y los elementos de secuencia de la segunda molécula de ácido nucleico están conectados de un modo que permite la expresión de la proteína de fusión como un único polipéptido.

30 Además, en algunos ejemplos, el enlace disulfuro que se produce de manera natural entre Cys 76 y Cys 175 puede eliminarse en muteínas de NGAL de la divulgación (incluyendo tal como están comprendidas en proteínas de fusión de la divulgación). Para las muteínas de Tlc de la divulgación (incluyendo tal como están comprendidas en proteínas de fusión de la divulgación), el enlace disulfuro que se produce de manera natural entre Cys 61 y Cys 153 puede eliminarse. Por consiguiente, tales muteínas o proteínas de fusión pueden producirse en un compartimento celular que tiene un medio redox reductor, por ejemplo en el citoplasma de bacterias Gram-negativas.

35 En caso de que una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la divulgación incluya enlaces disulfuro intramoleculares, puede preferirse dirigir el polipéptido naciente a un compartimento celular que tenga un medio redox oxidante usando una secuencia señal apropiada. Tal entorno oxidante puede proporcionarse por el periplasma de bacterias Gram-negativas tales como *E. coli*, en el medio extracelular de bacterias Gram-positivas o en la luz del retículo endoplasmático de células eucariotas y habitualmente favorece la formación de enlaces disulfuro estructurales.

40 Sin embargo, es también posible producir una muteína de lipocalina o una proteína de fusión de la divulgación en el citosol de una célula huésped, preferiblemente *E. coli*. En este caso, el polipéptido puede o bien obtenerse directamente en un estado soluble y plegado o bien recuperarse en forma de cuerpos de inclusión, seguido por renaturalización *in vitro*. Una opción adicional es el uso de cepas huésped específicas que tienen un medio extracelular oxidante, que puede así permitir la formación de enlaces disulfuro en el citosol (Venturi *et al.* (2002) *J. Mol. Biol.* 315, 1-8.).

45 Sin embargo, una muteína de lipocalina o una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento puede no generarse o producirse necesariamente solo mediante el uso de ingeniería genética. Más bien, tal muteína de lipocalina o proteína de fusión puede también obtenerse mediante síntesis química tal como síntesis de polipéptidos en fase sólida de Merrifield o por transcripción y traducción *in vitro*. Por ejemplo, es posible que se identifiquen mutaciones prometedoras usando modelado molecular y luego sintetizar los polipéptidos deseados (diseñados) *in vitro* e investigar la actividad de unión para IL-17A. Los métodos para la síntesis de proteínas en fase sólida y/o fase de disolución se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo Bruckdorfer, T. *et al.* (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 29-43).

En otra realización, las muteínas de lipocalinas o las proteínas de fusión de la divulgación pueden producirse mediante transcripción/traducción *in vitro* empleando métodos bien establecidos conocidos por los expertos en la técnica.

5 El experto en la técnica apreciará métodos útiles para preparar muteínas de lipocalinas contempladas por la presente divulgación pero cuyas secuencias de proteína o ácido nucleico no se dan a conocer explícitamente en el presente documento. Como visión general, tales modificaciones de la secuencia de aminoácidos incluyen, por ejemplo mutagénesis dirigida de posiciones de aminoácidos individuales con el objeto de simplificar la subclonación de un gen de lipocalina mutado o sus partes mediante la incorporación de sitios de escisión para ciertas enzimas de restricción.
10 Además, estas mutaciones pueden también incorporarse para mejorar adicionalmente la afinidad de una muteína de lipocalina o una proteína de fusión por su diana (por ejemplo IL-17A o IL-23p19, respectivamente). Además, pueden introducirse mutaciones para modular ciertas características de la muteína o la proteína de fusión, tal como, para mejorar la estabilidad de plegamiento, estabilidad en suero, resistencia de la proteína o solubilidad en agua o para reducir la tendencia a la agregación, si es necesario. Por ejemplo, residuos de cisteína que se produce de manera natural pueden mutarse a otros aminoácidos para prevenir la formación de puentes disulfuro.

Las muteínas de lipocalinas y proteínas de fusión, dadas a conocer en el presente documento, así como sus derivados pueden usarse en muchos campos de manera similar a anticuerpos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, las muteínas de lipocalinas y/o proteínas de fusión, así como sus derivados respectivos, pueden usarse para marcar con una enzima, un anticuerpo, una sustancia radioactiva o cualquier otro grupo que tenga actividad bioquímica o características de unión definidas. Al hacer esto, las respectivas dianas de las mismas pueden detectarse o ponerse en contacto con las mismas. Además, las muteínas de lipocalina y/o proteínas de fusión de la divulgación pueden servir para detectar estructuras químicas mediante métodos analíticos establecidos (por ejemplo ELISA o inmunotransferencia de tipo Western) o mediante microscopía o inmunosensores. En este sentido, la señal de detección puede generarse o bien directamente mediante el uso de una muteína adecuada o una proteína de fusión adecuada; o bien indirectamente mediante detección inmunoquímica de la muteína unida mediante un anticuerpo.

Otros armazones proteicos que pueden modificarse por ingeniería genética según la presente divulgación para proporcionar muteínas de proteínas que se unen a IL-17 y/o IL-23 con afinidad detectable incluyen: un dominio similar a EGF, un dominio Kringle, un dominio de fibronectina tipo I, un dominio de fibronectina tipo II, un dominio de fibronectina tipo III, un dominio PAN, un dominio G1a, un dominio SRCR, un dominio inhibidor de tripsina pancreática de Kunitz/Bovine, tendamistat, un dominio inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal, un dominio Trefoil (tipo P), un dominio de factor de von Willebrand tipo C, un dominio similar a anafilatoxina, un dominio CUB, una repetición de tiroglobulina tipo I, un dominio de receptor LDL0 clase A, un dominio Sushi, un dominio Link, un dominio de trombospondina tipo I, un dominio de inmunoglobulina o un dominio similar a inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpos de dominio o anticuerpos de cadena pesada de camélido), un dominio de lectina tipo C, un dominio MAM, un dominio de factor de von Willebrand tipo A, un dominio de somatomedina B, un dominio de cuatro núcleos disulfuro tipo WAP, un dominio F5/8 tipo C, un dominio de hemopexina, un dominio SH2, un dominio SH3, un dominio similar a EGF tipo laminina, un dominio C2, "cuerpos kappa" (Ill. *et al.* "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), "minicuerpos" (Martin *et al.* "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" *EMBO J* 13:5303-9 (1994)), "diacuerpos" (Holliger *et al.* "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993)), "janusinas" (Traunecker *et al.* "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker *et al.* "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)), un nanocuerpo, una adnectina, una tetranectina, un microcuerpo, una affilina, un afficuerpo, una anquirina, una cristalina, a knottina, ubiquitina, una proteína de dedos de zinc, una proteína autofluorescente, una anquirina o proteína de repetición de anquirina o una proteína de repetición rica en leucina, un avímero (Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, *Nat Biotech*, Dec; 23(12):1556-61, publicación E en *Nat Biotech*. Edición del 20 de noviembre de 2005); así como proteínas de avímero multivalentes desarrolladas por intercambio de exones de una familia de dominios de receptores humanos tal como también se describe en Silverman J, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP, *Nat Biotech*, Dic; 23(12):1556-61, publicación E en *Nat. Biotechnology*. Edición del 20 de noviembre de 2005).

Objetos, ventajas y características adicionales de esta divulgación resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos y figuras adjuntas de los mismos, que no pretenden ser limitativos.

V. Ejemplos

60 Ejemplo 1: Afinidad de muteína de lipocalina por IL-17A medida mediante SPR.

Para medir la afinidad de unión de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 por IL-17A, se empleó un ensayo basado en resonancia de plasmones superficiales (SPR) utilizando un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). En el ensayo de afinidad por SPR (figura 1), se inmovilizó IL-17A sobre un chip sensor usando química de aminas convencional: La superficie del chip se activó usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-

hidroxisuccinimida (NHS). Posteriormente, se aplicaron 5 $\mu\text{g/ml}$ de disolución de IL-17A en acetato 10 mM pH 5 a un caudal de 10 $\mu\text{l/min}$ hasta que se logró un nivel de inmovilización de 279 unidades de resonancia (RU). Los grupos activados residuales se extinguieron con etanolamina. Los canales de referencia se sometieron a inmovilización de blanco mediante tratamiento con EDC/NHS tras etanolamina.

5 Para determinar la afinidad, se prepararon cuatro diluciones de SEQ ID NO: 1 en buffer HBS-EP+ y se aplicaron a la superficie preparada del chip. El ensayo de unión se llevó a cabo con un tiempo de contacto de 300 s, tiempo de disociación de 1200 s y aplicando un caudal de 30 $\mu\text{l/min}$. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. La regeneración de la superficie con IL-17A inmovilizada se logró con inyecciones consecutivas de H_3PO_4 acuoso 10 mM (30 s) y glicina-HCl 10 mM pH 1,5 (15 s) seguido por un lavado extra con buffer de corrida y un período de estabilización de 30 s. Antes de las mediciones de las proteínas, se llevaron a cabo tres ciclos de puesta en marcha con propósitos de acondicionamiento. Los datos se evaluaron con el software Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Se utilizó doble referenciado. Se utilizó el modelo de unión 1:1 para ajustar los datos sin procesar.

15 Las curvas de ajuste resultantes se muestran en la figura 1. Los datos muestran que SEQ ID NO: 1 se unió con alta afinidad a IL-17A, con una constante de velocidad de asociación de $k_a = 7,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y una constante de velocidad de disociación de $k_d = 5,3 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$, dando como resultado una constante de disociación de $K_D = 0,8 \text{ nM}$.

Ejemplo 2: Afinidad de muteína de lipocalina por IL-17 A/F medida mediante SPR en un formato alternativo.

20 Para medir la afinidad de unión de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 por IL-17A/F en un ensayo basado en resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un formato alternativo de ensayo (capturando SEQ ID NO: 1 como ligando y aplicando IL-17A/F humana como analito), se usó un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). En este formato, se empleó IL-17A/F humana (en oposición a la IL-17A homodimérica, que se usó en el ejemplo 1) para evitar posibles efectos de avidéz en el ensayo. Se biotinó SEQ ID NO: 1 durante 2 h a temperatura ambiente aplicando un exceso apropiado de EZ-Link NHS-PEG4-biotina (Thermo, n.º de cat. 21329) seguido por la separación de la biotina sin reaccionar usando una placa de desalación Zeba Spin (Thermo, n.º de cat. 21329) según las instrucciones del fabricante.

30 En el ensayo de afinidad por SPR, se capturó SEQ ID NO: 1 biotinilada sobre un chip sensor CAP usando el kit de captura de biotina (GE Healthcare): El chip sensor CAP se preinmovilizó con un oligonucleótido de ADNmc. Se aplicó reactivo de captura de biotina no diluido (estreptavidina conjugada con el oligonucleótido de ADNmc complementario) a un caudal de 2 $\mu\text{l/min}$ durante 300 s. Posteriormente, se aplicaron de 0,4 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de SEQ ID NO: 1 biotinilada durante 300 s a un caudal de 5 $\mu\text{l/min}$. El canal de referencia se cargó con reactivo de captura de biotina solamente.

35 Para determinar la afinidad de unión, se prepararon cinco diluciones de IL-17A/F humana (0,2 – 20 nM) en tampón HBS-EP+ y se aplicaron a la superficie preparada del chip. Aplicando un caudal de 30 $\mu\text{l/min}$, se usó un enfoque de cinética de un único ciclo con un tiempo de contacto de la muestra de 300 s y un tiempo de disociación de 2400 s. Después de la inmovilización del ligando, las 5 concentraciones se aplicaron consecutivamente en orden ascendente antes de monitorizar la disociación. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. La regeneración de la superficie del chip sensor CAP se logró con una inyección de GUA-HCl 6 M con NaOH 0,25 M seguido por un lavado extra con buffer de corrida y un período de estabilización de 120 s. Los datos se evaluaron con el software Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Se usó doble referenciado. Se usó un modelo de unión 1:1 de cinética de un único ciclo para ajustar los datos sin procesar.

45 Las curvas de ajuste resultantes se muestran en la figura 2. Los datos muestran que SEQ ID NO: 1 se unió con alta afinidad a IL-17A/F humana, con una constante de velocidad de asociación $k_a = 1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y una constante de velocidad de disociación $k_d = 1,2 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$, dando como resultado una constante de disociación de equilibrio calculada de $K_D = 100 \text{ pM}$. Una comparación con el ejemplo 1 muestra que el resultado del ensayo de SPR es alto dependiente del formato del ensayo. Sin embargo, en ambos formatos, la afinidad de SEQ ID NO: 1 por IL-17A humana e IL-17A/F humana, respectivamente, es alta y en el intervalo subnanomolar. El ensayo es importante para permitir una comparación entre SEQ ID NO: 1 y fusiones que contienen esta muteína (véase más adelante el ejemplo 11).

Ejemplo 3: Modo de acción competitivo de muteína de lipocalina que se une a IL-17A.

55 Se sometió a prueba *in vitro* si SEQ ID NO: 1 se une a IL-17A de modo competitivo usando un formato de ELISA de competición (figura 3). En este experimento, se incubó una concentración constante de IL-17A humana biotinilada con concentraciones variables de SEQ ID NO: 1 durante 1 h. Después de esta preincubación en disolución, se transfirió una alícuota de la mezcla de muteína de lipocalina/IL-17A a una placa de ELISA recubierta con IL-17RA humano para medir la concentración de hIL-17A que no se bloqueó para unirse a hIL-17RA (figura 3).

65 Todas las etapas de incubación se llevaron a cabo con agitación a 300 rpm, y la placa se lavó después de cada etapa de incubación con 80 μl de tampón PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,05%) cinco veces usando una lavadora Biotek EL405 Select CW. En la primera etapa, una placa MSD de 384 pocillos se recubrió directamente con 20 μl de IL-17RA humano soluble a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS durante la noche a 4°C. Después del lavado, los pocillos recubiertos

con el receptor se bloquearon con 60 μ l de PBS-T/BSA (BSA al 2% en PBS que contiene Tween 20 al 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente.

Una concentración fija de IL-17A humana 0,01 nM se incubó en disolución con concentraciones variables de SEQ ID NO: 1, o con SEQ ID NO: 41 como control negativo, usando una concentración de partida adecuada de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 41 que se diluyó en serie a una razón 1:4 descendiendo hasta el intervalo picomolar en tampón PBS-T/BSA. Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron 20 μ l de la mezcla de reacción a la placa MSD recubierta con hIL-17RA para capturar hIL-17A no unida (libre) o no competitivamente unida durante 20 min a TA. Para permitir la transformación de los resultados de lectura de ELISA en concentraciones de hIL-17A libre absolutas (véase a continuación), se preparó una curva patrón que contiene concentraciones variables de hIL-17A en PBS-T/BSA y se incubó también durante 20 min en la misma placa MSD.

Para permitir la detección y cuantificación de hIL-17A biotinilada unida, se descartaron los sobrenadantes residuales y se añadieron 20 μ l de etiqueta de estreptavidina sulfato a una concentración de 1 μ g/ml en PBS-T/BSA y se incubó durante 1 h a TA. Después del lavado, se añadieron 60 μ l de tampón de lectura MSD T (2x) a cada pocillo y la placa se leyó en el plazo de 15 min.

La señal de electroluminiscencia (ECL) resultante se midió usando el instrumento SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery). La evaluación se realizó tal como sigue: se calculó la concentración de IL-17A libre $c(\text{IL-17A})_{\text{libre}}$ (a partir de la curva patrón determinada en paralelo) y se representó gráficamente frente a la concentración de SEQ ID NO: 1, $c(\text{SEQ ID NO: 1})$. Para obtener la concentración de SEQ ID NO: 1 a la cual la formación del complejo de IL-17A/IL-17RA se bloqueó en un 50% (CI50), se ajustaron las curvas mediante regresión no lineal con un modelo de unión de un único sitio según $c(\text{IL-17A})_{\text{libre}} = c(\text{IL-17A})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{SEQ ID NO: 1}) / \text{CI50})$, con la concentración total de trazador $c(\text{IL-17A})_{\text{tot}}$ y el valor de CI50 como parámetros libres. El ajuste de la curva se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism 4.

La figura 3 muestra que el control negativo SEQ ID NO: 41 no se une a hIL-17A; en cambio, SEQ ID NO: 1 demuestra una fuerte unión competitiva a hIL-17A, con un valor de CI50 ajustado de 75 pM.

Ejemplo 4: Especificidad y reactividad cruzada de especie de las muteínas de lipocalina para IL-17A.

La especificidad y reactividad cruzada de especie (figura 4) de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 se evaluaron mediante un "ELISA de competición en disolución", cuyo principio del cual es tal como sigue: Se incubó una concentración constante de SEQ ID NO: 1 con concentraciones variables de ligandos de IL-17A humana, IL-17A de mono cynomolgus (cIL-17A) e IL-17A de mono tití durante 1 h. Después de esta preincubación en disolución, se transfirió una alícuota de la mezcla de muteína/ligando a una placa de ELISA con hIL-17A biotinilada inmovilizada por medio de neutravidina para medir la concentración remanente de SEQ ID NO: 1 libre. La concentración de SEQ ID NO: 1 libre (no unida a ligando) se determinó mediante una configuración de ELISA cuantitativo (figura 4). Obsérvese que este ensayo se basó en que todos los ligandos seleccionaban como diana en el mismo sitio de unión sobre la SEQ ID NO: 1, es decir que los ligandos se unieron a la SEQ ID NO: 1 en competición entre sí.

En el siguiente protocolo experimental detallado, las etapas de incubación y lavado se llevaron a cabo tal como se describió anteriormente en el protocolo de ELISA de competición. Una placa de 384 pocillos adecuada para mediciones de fluorescencia (Greiner FLUOTRAC™ 600, fondo plano negro, alta unión) se recubrió con 20 μ l de neutravidina a una concentración de 5 μ g/ml en PBS durante la noche a 4°C. Después del lavado, los pocillos recubiertos con neutravidina se bloquearon con 100 μ l de tampón de bloqueo (PBS-T/BSA) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del nuevo lavado, se añadieron 20 μ l de hIL-17A biotinilada a una concentración de 1 μ g/ml en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, y el reactivo en exceso se eliminó.

Se incubó una concentración fija de SEQ ID NO: 1 0,25 nM en disolución con concentraciones variables de ligandos (hIL-17A, cIL-17A e IL-17A de mono tití), usando una concentración de partida adecuada que se diluyó en serie a una razón 1:3 descendiendo hasta el intervalo picomolar en PBS-T/BSA. Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron 20 μ l de la mezcla de reacción a la placa de 384 pocillos luego de lo cual se inmovilizó hIL-17A biotinilada para capturar SEQ ID NO: 1 no unida (libre) durante 20 min a TA. Para permitir la transformación de los resultados de lectura de ELISA en concentraciones de SEQ ID NO: 1 libre absolutas (véase a continuación), se preparó una curva patrón que contenía concentraciones variables de SEQ ID NO: 1 en PBS-T/BSA y se incubó también durante 20 min en la misma placa de ELISA.

Se desecharon los sobrenadantes residuales y se agregaron 20 μ l de anticuerpo anti-lipocalina marcado con HRP a una concentración óptima predeterminada en PBS-T/BSA y se incubó durante 1 h a TA. El anticuerpo anti-lipocalina se había obtenido por inmunización de conejos con una mezcla de muteínas de lipocalina, y se acopló posteriormente a HRP utilizando un kit (EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante, para obtener el conjugado de anticuerpo-HRP. Después del lavado, se añadieron 20 μ l de sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Pierce) a cada pocillo, y se dejó proceder la reacción durante 60 minutos. Se leyó la intensidad de fluorescencia de cada pocillo en la placa usando un lector de microplacas Genios Plus (Tecan). Para

evaluar los datos, se calculó la concentración de SEQ ID NO: 1 libre, $c(\text{SEQ ID NO: 1})_{\text{libre}}$, basándose en los resultados de la curva patrón, y se representó gráficamente frente a la concentración de ligando, $c(\text{ligando})$. Para obtener la concentración de ligando a la cual se bloqueó la formación del complejo de IL-17A/SEQ ID NO: 1 en un 50% (CI50), se ajustaron las curvas mediante regresión no lineal con un modelo de unión de un único sitio según $c(\text{SEQ ID NO: 1})_{\text{libre}} = c(\text{SEQ ID NO: 1})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{ligando}) / \text{CI50})$, con la concentración total de trazador $c(\text{SEQ ID NO: 1})_{\text{tot}}$ y el valor de CI50 como parámetros libres. El ajuste de las curvas se realizó usando el software GraphPad Prism 4.

En resumen, el ajuste de la curva proporcionó los siguientes resultados: $\text{CI50}_{\text{hIL-17A}} = 0,1 \text{ nM}$, $\text{CI50}_{\text{cIL-17A}} = 0,1 \text{ nM}$ y $\text{CI50}_{\text{IL-17A mono de tití}} = 0,2 \text{ nM}$. Tal como se ilustra en la figura 4, los datos demuestran que SEQ ID NO: 1 presenta al afinidad hacia IL-17A de humanos, de mono cynomolgus y de mono tití, y por tanto, muestra que SEQ ID NO: 1 es completamente reactiva en manera cruzada con IL-17A de cynomolgus y de mono tití.

Ejemplo 5: Bloqueo mediado por muteínas de lipocalinas de la secreción de G-CSF inducida por IL-17A en un ensayo basado en células.

Se empleó un ensayo basado en células para demostrar la capacidad de SEQ ID NO: 1 para bloquear la actividad biológica de IL-17A. El ensayo se basó en la secreción de G-CSF inducida por IL-17A en células U87-MG (n.º de catálogo de la ATCC HTB-14). Este ensayo funcional altamente sensible se empleó para comparar la potencia de SEQ ID NO: 1 con dos anticuerpos de referencia que se desarrollan clínicamente. En este ensayo, se preincubó hIL-17A recombinante con SEQ ID NO: 1, moléculas de anticuerpo de referencia o controles y se añadió a las células. Además de la SEQ ID NO: 1, las siguientes referencias y controles se incluyeron en el ensayo: anticuerpo de referencia 1 (cadena pesada SEQ ID NO: 53; cadena ligera SEQ ID NO: 54), anticuerpo de referencia 2 (cadena pesada SEQ ID NO: 55; cadena ligera SEQ ID NO: 56) y SEQ ID NO: 2 y anticuerpo de isotipo IgG humano (Dianova, n.º de cat. 009-000-002) como controles negativos. La concentración de G-CSF en el sobrenadante se midió entonces mediante ELISA.

Se cultivaron células U87-MG en matraces de cultivo celular en condiciones convencionales (medio de Eagle modificado por Dulbecco DMEM (PAN Biotech GmbH) que contenía el 10% de suero fetal bovino FCS (PAA Laboratories), 37°C, atmósfera del 5% de CO₂).

En el día 1 del experimento, se disociaron las células adherentes de su sustrato con Accutase (PAA Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1000 rpm, se resuspendieron en medio y se filtraron a través de un filtro de células de 100 µm (Falcon) para eliminar agregados celulares. Entonces se sembraron las células en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos (Greiner) a una densidad de 5000 células por pocillo usando un volumen final de 100 µl. Se incubaron durante la noche en condiciones convencionales.

Las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, un anticuerpo de isotipo IgG humano (Dianova, n.º de cat. 009-000-002), anticuerpo de referencia 1 y anticuerpo de referencia 2 (tal como se describió anteriormente) fueron las moléculas bajo estudio ("MUS"). El día 2, se reemplazó el medio de las células que se hicieron crecer en la placa de 96 pocillos por 80 µl de medio fresco y posteriormente se añadieron a las células una concentración fija de hIL-17A recombinante 0,1 nM y una serie de dilución de disoluciones de MUS. Esto se realizó por triplicado para cada MUS o control. Las células se incubaron durante 20-24 horas adicionales en condiciones convencionales. Antes de la recolección de los sobrenadantes para la medición de los niveles de G-CSF, se inspeccionaron los pocillos visualmente con un microscopio. Los pocillos que presentaban considerable muerte celular o la presencia de agregados celulares se excluyeron de la evaluación. Los niveles de G-CSF se determinaron usando el kit ultrasensible de G-CSF de MSD. Para evaluar los datos, se representó gráficamente la concentración de G-CSF en unidades arbitrarias frente a la concentración de MUS, $c(\text{MUS})$. Para obtener la concentración de MUS a la cual la inducción de producción de G-CSF por las células U-87 MG se redujo hasta el 50% (CI50), se ajustaron las curvas mediante regresión no lineal con un modelo de unión de un único sitio según $c(\text{G-CSF}) = c(\text{G-CSF})_{\text{Min}} + [c(\text{G-CSF})_{\text{Max}} - c(\text{G-CSF})_{\text{Min}}] / [1 + c(\text{MUS}) / \text{CI50}]$, siendo los parámetros libres la CI50, la concentración de G-CSF inducida $c(\text{G-CSF})_{\text{Max}}$ y la concentración de G-CSF no inducida $c(\text{G-CSF})_{\text{Min}}$. En este caso, se supuso que $c(\text{G-CSF})_{\text{Max}}$ y $c(\text{G-CSF})_{\text{Min}}$ eran independientes de la molécula antagonista o de control en estudio, y por tanto se ajustaron a valores comunes para todas las moléculas.

La figura 5 muestra un ejemplo representativo del experimento, que se llevó a cabo por duplicado. El valor de CE50 promedio resultante para SEQ ID NO: 1 fue de 0,13 nM (0,17 nM en el primer experimento, 0,10 nM en el experimento de repetición), que era significativamente más potente que la referencia 1, que presentó una CE50 = 2,33 (2,65/2,01) nM, y en un intervalo similar en comparación con la referencia 2, con una CE50 = 0,12 (0,14/0,10) nM. Los controles negativos, que consistían en SEQ ID NO: 2 y anticuerpo de isotipo IgG humano (Dianova, n.º de cat 009-000-002, no mostrado en la figura 5), no tuvieron efecto sobre la producción de G-CSF inducida por IL-17A de las células.

Ejemplo 6: Afinidad de muteína de lipocalina por IL-23 medida mediante SPR.

Para medir la afinidad de unión de las muteínas de lipocalinas de SEQ ID NO: 2 a IL-23 humana, se empleó un ensayo basado en resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). En el

ensayo de afinidad por SPR (figura 6), se inmovilizó hIL-23 sobre un chip sensor utilizando química de aminas convencional: La superficie del chip se activó usando EDC y NHS. Posteriormente, se aplicaron 5 µg/ml de disolución de hIL-23 en acetato 10 mM pH 4,5 a un caudal de 10 µl/min hasta que se alcanzó un nivel suficiente de inmovilización. Los grupos activados residuales se extinguieron con etanolamina. Los canales de referencia se trataron con EDC/NHS tras la etanolamina (inmovilización de blanco).

Para determinar la afinidad de unión de SEQ ID NO: 2, se prepararon cinco diluciones de SEQ ID NO: 2 en tampón HBS-EP+ y se aplicaron a la superficie preparada del chip. El ensayo de unión se llevó a cabo con un tiempo de contacto de 300 s, tiempo de disociación de 1200 s y aplicando un caudal de 30 µl/min. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. La regeneración de la superficie con IL-23 inmovilizada se logró por inyección de H₃PO₄ acuoso 10 mM (30 s) seguido por un lavado extra con tampón de corrida y un período de estabilización de 30 s. Antes de las mediciones de las proteínas, se llevaron a cabo tres ciclos de puesta en marcha con propósitos de acondicionamiento. Los datos se evaluaron con el software Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Se usó doble referenciado. Se usó el modelo de unión 1:1 para ajustar los datos sin procesar.

La figura 6 muestra un ejemplo representativo del experimento, el cual se llevó a cabo por triplicado. Las curvas de ajuste resultantes demuestran que SEQ ID NO: 2 se unió con alta afinidad a hIL-23, con una constante de velocidad de asociación de $k_a = 5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y una constante de velocidad de disociación de $k_d = 1,9 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$. La constante de disociación promedio determinada en tres experimentos replicados fue de $K_D = 0,35 \pm 0,20 \text{ nM}$, demostrando la interacción de alta afinidad entre SEQ ID NO: 2 e IL-23 humana.

Ejemplo 7: Afinidad de muteína de lipocalina por IL-23 medida mediante SPR en un formato alternativo.

Para medir la afinidad de unión de SEQ ID NO: 2 a IL-23 humana usando resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un formato alternativo de ensayo (capturando SEQ ID NO: 2 como ligando y aplicando hIL-23 como analito) se usó un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). La SEQ ID NO: 2 y los controles se biotinilaron tal como se describió en el ejemplo 2. En el ensayo de afinidad por SPR, se capturó SEQ ID NO: 2 biotinilada sobre un chip sensor CAP utilizando el kit de captura de biotina (GE Healthcare). Con este objetivo, se aplicó reactivo de captura de biotina no diluido a un caudal de 2 µl/min durante 300 s. Posteriormente, se aplicaron de 0,4 a 10 µg/ml de SEQ ID NO: 2 biotinilada o controles durante 300 s a un caudal de 5 µl/min. El canal de referencia se cargó sólo con reactivo de captura de biotina.

Para determinar la afinidad de unión, se prepararon cinco diluciones de hIL-23 (7 – 600 nM) en tampón HBS-EP+ suplementado con NaCl 350 mM y se aplicaron a la superficie preparada del chip. La adición de NaCl 350 mM se requería para minimizar la interacción no específica de hIL-23 con la superficie del chip. Aplicando un caudal de 30 µl/min, se usó un enfoque de cinética de un único ciclo con un tiempo de contacto de la muestra de 300 s y un tiempo de disociación de 4000 s o 7200 s. Después de la inmovilización del ligando, las 5 concentraciones se aplicaron consecutivamente en orden ascendente antes de monitorizar la disociación. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. La regeneración de la superficie del chip sensor CAP y los datos de evaluación se lograron tal como se describió en el ejemplo 2.

Las curvas de ajuste resultantes se muestran en la figura 7. Los datos muestran que SEQ ID NO: 2 se unió con afinidad bastante elevada a hIL-23, con una constante de velocidad de asociación de $k_a = 1,23 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y una constante de velocidad de disociación de $k_d = 3,55 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$, dando como resultado una constante de disociación de equilibrio calculada de $K_D = 2,9 \text{ nM}$. Una comparación con el ejemplo 6 muestra una fuerte caída en la afinidad cuando se usa este formato de ensayo de SPR, lo cual es atribuible a la concentración elevada y no fisiológica de NaCl (350 mM) que tuvo que incluirse en el tampón para minimizar interacciones no específicas de la hIL-23 con la superficie del chip, y por tanto para facilitar llevar a cabo el ensayo en este formato. El ensayo es importante para permitir una comparación entre SEQ ID NO: 2 y fusiones que contienen esta muteína (véase más adelante el ejemplo 11).

Ejemplo 8: Modo de acción competitivo de muteínas de lipocalina que se unen a IL-23.

Se sometió a prueba *in vitro* si la muteína de lipocalina SEQ ID NO: 2 se une a hIL-23 de un modo competitivo usando un formato ELISA de competición (figura 8), en analogía con el ejemplo 3, pero usando hIL-23 como diana.

Todas las etapas de incubación se llevaron a cabo con agitación a 300 rpm, y la placa se lavó después de cada etapa de incubación con 80 µl de PBS/Tween 20 al 0,05% cinco veces usando un lavador Biotek EL405 Select CW. Una placa MSD de 384 pocillos se recubrió directamente con 20 µl de receptor de IL-23 humano soluble a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante la noche a 4°C. Después del lavado, los pocillos recubiertos con el receptor se bloquearon con 60 µl de PBS-T/BSA durante 1 h a temperatura ambiente.

Se incubó una concentración fija de IL-23 humana biotinilada 0,01 nM en disolución con concentraciones variables de SEQ ID NO: 2, o con SEQ ID NO: 43 como control negativo, usando concentraciones de partida adecuadas que se diluyeron en serie a una razón de 1:4 descendiendo hasta el intervalo picomolar en PBS-T/BSA. Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron 20 µl de la mezcla de reacción a la placa MSD recubierta con

receptor de IL-23 para capturar hIL-23 no unida (libre) o no competitivamente unida durante 20 min a TA. Para permitir la transformación de los resultados de lectura de ELISA en concentraciones de hIL-23 libre absolutas (véase más adelante), se preparó una curva patrón que contenía concentraciones variantes de hIL-23 partiendo de 100 nM (diluida en serie 1:4 en 11 etapas) en PBS-T/BSA y se incubó también durante 20 min en la misma placa MSD. Para permitir la detección y cuantificación de hIL-23 biotinilada unida, se desecharon los sobrenadantes residuales y se añadieron 20 μ l de etiqueta estreptavidina sulfo a una concentración de 1 μ g/ml en PBS-T/BSA y se incubó durante 1 h a TA. Después del lavado, se añadieron 60 μ l de tampón de lectura MSD T (2x) a cada pocillo y se leyó la placa en el plazo de 15 min.

La señal de ECL resultante se midió usando el instrumento SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery). La evaluación se llevó a cabo en analogía con el ejemplo 3. Tal como se muestra en la figura 8, el control negativo SEQ ID NO: 43 no se unió a hIL-23, en cambio, la SEQ ID NO: 2 demostró una unión competitiva a hIL23, con un valor de CI50 ajustado de 0,54 nM.

15 Ejemplo 9: Especificidad y reactividad cruzada de especie de las muteínas de lipocalina para IL-23.

La especificidad y reactividad cruzada de especie de la muteína de lipocalina de la SEQ ID NO: 2 (figura 9) se sometió a ensayo mediante un "ELISA de competición en disolución", en analogía con el ejemplo 4, pero estudiando diferentes ligandos, concretamente, IL-23 de humanos, de mono cynomolgus (cIL-23), mono tífi y ratón.

En el siguiente protocolo experimental detallado, las etapas de incubación y lavado se llevaron a cabo tal como se describió anteriormente en el protocolo de ELISA de competición. Una placa de 384 pocillos adecuada para mediciones de fluorescencia (Greiner FLUOTRAC™ 600, fondo plano negro, alta unión) se recubrió con 20 μ l de neutravidina a una concentración de 5 μ g/ml en PBS durante la noche a 4°C. Después del lavado, los pocillos recubiertos con neutravidina se bloquearon con 100 μ l de PBS-T/BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Después del nuevo lavado, se añadieron 20 μ l de hIL-23-Bio biotinilada a una concentración de 0,25 μ g/ml en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, y se eliminó el reactivo en exceso.

Se incubó una concentración fija de SEQ ID NO: 2 0,5 nM en disolución con concentraciones variables de los ligandos (hIL-23, cIL-23, IL-23 de mono tífi e IL-23 de ratón), usando una concentración de partida adecuada que se diluyó en serie a una razón de 1:3 descendiendo hasta el intervalo picomolar en PBS-T/BSA. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron 20 μ l de la mezcla de reacción a la placa de 384 pocillos recubierta con hIL-23 para capturar SEQ ID NO: 2 no unida (libre) durante 20 min a TA. Para permitir la transformación de los resultados de lectura de ELISA en concentraciones de SEQ ID NO: 2 libre absolutas (véase más adelante), se preparó una curva patrón que contenía concentraciones variables de SEQ ID NO: 2 en PBS-T/BSA y se incubó también durante 20 min en la misma placa MSD.

Para cuantificar la SEQ ID NO: 2 capturada en la placa, se desecharon los sobrenadantes residuales y se añadieron 20 μ l de anticuerpo anti-lipocalina marcado con HRP a una concentración óptima predeterminada en PBS-T/BSA y se incubó durante 1 h a TA. El anticuerpo anti-lipocalina se había obtenido por inmunización de conejos con una mezcla de muteínas de lipocalina, y posteriormente se acopló a HRP utilizando un kit (EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante, para obtener el conjugado de anticuerpo-HRP. La manipulación adicional de las placas, adquisición y evaluación de datos se llevaron a cabo como se describió en el ejemplo 4.

Tal como se muestra en la figura 9, el resultado demuestra que la SEQ ID NO: 2 es completamente reactiva de manera cruzada con IL-23 humana y de ratón, y presenta una afinidad algo reducida hacia IL-23 de cynomolgus y mono tífi, con $CI_{50_{hIL-23}} = 0,9$ nM, $CI_{50_{cIL-23}} = 4,8$ nM, $CI_{50_{IL-23 \text{ de mono tífi}}} = 12$ nM y $CI_{50_{hIL-23}} = 0,5$ nM.

50 Ejemplo 10: Bloqueo mediado por muteínas de lipocalinas de IL-23 en ensayos de proliferación basados en células

La capacidad de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 para neutralizar la actividad biológica de hIL-23 se evaluó mediante la aplicación de bioensayos de proliferación a corto plazo empleando células que expresan de manera recombinante el receptor de IL-23 humano. La línea celular transfectante Ba/F3 expresa ambas subunidades del receptor, hIL-23R y hIL-12R β 1, y responde tanto a IL-23 humana como IL-23 de mono cynomolgus. Las células Ba/F3 proliferan en respuesta a hIL-23 de una manera dependiente de la dosis, y la proliferación puede inhibirse por un agente neutralizante de hIL-23. En el ensayo, se preincubó SEQ ID NO: 2 a diversas concentraciones con una cantidad constante de hIL-23, y las mezclas se añadieron posteriormente a células Ba/F3 en cultivo. Después de tres días en cultivo, el grado de proliferación se evaluó cuantificando el número de células viables. Esto se llevó a cabo usando el ensayo de viabilidad de células luminiscente CellTiter-Glo (n.º de cat. de Promega G7571) para medir niveles de ATP, los cuales se correlacionan con el número de células metabólicamente activas. La capacidad de SEQ ID NO: 2 para neutralizar hIL-23 se evaluó mediante su valor de CI50, es decir la concentración de la muteína de lipocalina que conduce a la mitad de la inhibición máxima de la proliferación inducida por hIL-23.

El procedimiento detallado de configuración del ensayo se describe en el presente documento a continuación. Se

mantuvieron Ba/F3 transfectantes en medio RPMI-1640, suero fetal bovino al 10%, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, geneticina (G418) 500 µg/ml, rIL-3 1 ng/ml, puromicina 2 µg/ml y zeocina 200 µg/ml. Los ensayos de proliferación de Ba/F3 se llevaron a cabo en medio RPMI-1640, suero fetal bovino al 10% y 2-mercaptoetanol 0,05 mM. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de fondo plano, blancas de 384 pocillos (Greiner) en 25 µl por pocillo.

5 El día 1, las células de un cultivo celular en suspensión de Ba/F3 se contaron, se sedimentaron, se lavaron dos veces en medio de ensayo y se sembraron en placa a una densidad de 2500 células por pocillo. Se añadieron a los pocillos 50 pM de hIL-23 (n.º de cat. HZ-1254, HumanZyme), correspondiente a la CE50 predeterminada requerida para inducir la proliferación de células Ba/F3 y una serie de dilución de SEQ ID NO: 2, un control negativo (anticuerpo de isotipo IgG humano, n.º de cat. 009-000-003, Dianova) y de anticuerpos de referencia (referencia 3: SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, referencia 4: SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60). Todas las series de titulación se llevaron a cabo con una dilución 1:3 en serie en medio de ensayo y una concentración de partida adecuada. Posteriormente, se dejó que proliferaran las células durante 72 horas a 37°C. Para garantizar que la potencia de hIL-23 no estaba sometida a variabilidad entre días o dentro del día, la respuesta de proliferación dependiente de dosis de las células Ba/F3 a hIL-23 se verificó añadiendo una serie de dilución de hIL-23 sola a las células Ba/F3, usando etapas de dilución de 1:3 en medio de ensayo partiendo de 50 nM. Para cuantificar la proliferación celular después de 72 horas, se añadieron 25 µl de reactivos CellTiter-Glo a las células en cada uno de los pocillos y se incubó durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular, y se midió la luminiscencia usando el lector PheraStar FS.

20 Los valores de CE50 se determinaron usando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, California, EE.UU.) representando gráficamente la señal de luminiscencia contra la concentración de las muestras y regresión no lineal de los datos con un modelo de respuesta a la dosis sigmoideo.

25 El resultado del experimento se muestra en la figura 10. El ensayo de proliferación dado a conocer anteriormente es representativo de dos experimentos. La SEQ ID NO: 2 presentó una CE50 promedio de 1,2 nM (1,7 nM en un primer experimento, 0,7 nM en el experimento de repetición), la referencia 3 presentó una CE50 de 3,0 nM (3,1/2,9) y la referencia 4 presentó una CE50 de 1,2 nM (0,8/1,5). El control negativo no tuvo efecto sobre la proliferación. Los datos demuestran por tanto que la SEQ ID NO: 2 y las moléculas de referencia presentan una potencia comparable en este ensayo funcional.

30 Ejemplo 11: Diseño y caracterización de proteínas de fusión

Diversas proteínas de fusión que contenían o bien una o bien ambas muteínas de lipocalina de unión a IL-17A e IL-23 se generaron, expresaron y caracterizaron tal como sigue y tal como se ilustra en la figura 11.

35 La SEQ ID NO: 8 es una proteína de fusión de SEQ ID NO: 1 y un péptido de unión a albúmina desimmunizado (dABD, SEQ ID NO: 15), el cual se deriva del dominio de unión a albúmina de la proteína G de estreptococos.

40 La SEQ ID NO: 7 es una proteína de fusión de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 15.

La SEQ ID NO: 10 es una proteína de fusión homodimérica de dos secuencias de SEQ ID NO: 1 seguidas, unidas mediante el ligador SEQ ID NO: 18, y fusionadas a SEQ ID NO: 15.

45 La SEQ ID NO: 3 es una proteína de fusión heterodimérica de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, unidas mediante el ligador SEQ ID NO: 18; mientras que SEQ ID NO: 4 es una proteína de fusión heterodimérica con un orden de muteínas de lipocalinas inverso, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 1, y unidas con el ligador ligeramente diferente SEQ ID NO: 19.

50 La SEQ ID NO: 5 es una proteína de fusión correspondiente a la SEQ ID NO: 3, pero con una fusión C-terminal adicional con el dominio de unión a albúmina de la proteína G de estreptococos (SEQ ID NO: 14).

La SEQ ID NO: 9 es una proteína de fusión correspondiente a la SEQ ID No: 3, pero con una fusión C-terminal adicional con dABD (SEQ ID NO: 15).

55 La SEQ ID 6 es una proteína de fusión trimérica que consiste en dos secuencias de SEQ ID NO: 1 seguidas, fusionadas de manera C-terminal con SEQ ID NO: 2 y dABD (SEQ ID NO: 15). Los ligadores entre las lipocalinas consistían en SEQ ID NO: 18.

60 También se generaron proteínas de fusión de uno o más restos de SEQ ID NO: 1 con la parte Fc de IgG1, que corresponde a la SEQ ID NO: 16:

La SEQ ID NO: 11 es una proteína de fusión correspondiente a una fusión C-terminal de SEQ ID NO: 1 con SEQ ID NO: 16, unidas por medio el ligador peptídico SEQ ID NO: 19.

65 La SEQ ID NO: 12 es una proteína de fusión correspondiente a una fusión doble N- y C-terminal de la SEQ ID NO: 1, de modo que la molécula de Fc de SEQ ID NO: 16 está dotada de la SEQ ID NO: 1 en ambos extremos N- y C-terminales.

La SEQ ID NO: 13 es una proteína de fusión correspondiente a una fusión C-terminal de la proteína de fusión homodimérica de SEQ ID NO: 10 con la molécula de Fc de SEQ ID NO: 16.

5 Todas las proteínas de fusión, cuando era aplicable, se caracterizaron completamente mediante ensayos exactamente como se describió anteriormente para SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2: ensayos de ELISA de competición para hIL-17A (ejemplo 3) y hIL-23 (ejemplo 8), ensayos de SPR donde la proteína de fusión se inmovilizó sobre un chip de SPR para hIL-17AF (ejemplo 2) y hIL-23 (ejemplo 6), y ensayos funcionales basados en células tal como se describe para hIL-17A (ejemplo 5) y hIL-23 (ejemplo 10).

10 Los resultados experimentales se resumen en la tabla 1. La tabla proporciona una visión general de la actividad de muteínas de lipocalinas individuales SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, en comparación con sus proteínas de fusión SEQ ID NO: 3-13 en ELISA de competición, resonancia de plasmones superficiales (SPR) y ensayos funcionales basados en células. Se determinaron valores para la interacción con IL-17 y/o IL-23, dependiendo de si el respectivo constructo contiene la muteína de lipocalina de unión a IL-17A SEQ ID NO: 1, la muteína de lipocalina de unión a IL-23 SEQ ID NO: 2, o ambas. Para determinar la actividad hacia IL-17 e IL-23, respectivamente, se llevaron a cabo experimentos de ELISA de competición tal como se describe en el ejemplo 3 y/o el ejemplo 8, se llevaron a cabo experimentos de SPR en formato inverso, es decir con los constructos proteicos inmovilizados sobre el chip sensor, como se describe en el ejemplo 2 y/o el ejemplo 6, y los ensayos celulares se basaron en la secreción de G-CSF inducida por IL-17A (ejemplo 5) y/o proliferación de células Ba/F3 inducida por IL-23 (ejemplo 10). Obsérvese que el experimento de SPR en formato inverso realizado para determinar la afinidad por IL-23 se llevó a cabo en presencia de concentraciones elevadas no fisiológicas de NaCl, y que los valores por tanto no reflejan la afinidad por IL-23 en condiciones fisiológicas, sino que sirven para determinar si la afinidad relativa por IL-23 es diferente en las proteínas de fusión SEQ ID NO: 3-13 en comparación con las muteínas individuales SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. La tabla 1 demuestra que la actividad de unión a IL-17 de todas las fusiones que contienen SEQ ID NO: 1 es al menos tan buena como la de SEQ ID NO: 1 en sí misma en todos los formatos de ensayo. La SEQ ID NO: 1 puede por tanto emplearse de manera flexible en cualquier proteína de fusión sin pérdida de actividad. La actividad de unión a IL-23 de todas las fusiones que contienen SEQ ID NO: 2 es muy cercana a la de SEQ ID NO: 2 en sí misma en todos los formatos de ensayo. La SEQ ID NO: 2 puede por tanto emplearse de manera flexible en cualquier proteína de fusión sin pérdida significativa de actividad.

30 Ejemplo 12: Un experimento de SPR diseñado para mostrar la unión simultánea de todas las dianas mediante una proteína de fusión

35 Para demostrar la unión simultánea de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 9 a hIL-17A, hIL-23 y albúmina sérica humana (HSA), se empleó un ensayo basado en resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). Se biotiniló SEQ ID NO: 9 tal como se describió en el ejemplo 2. En el ensayo de afinidad por SPR, se capturó SEQ ID NO: 9 biotinilada sobre un chip sensor CAP usando el kit de captura de biotina (GE Healthcare). Con este fin, se aplicó reactivo de captura de biotina no diluido a un caudal de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 300 s. Posteriormente, se aplicaron de 0,4 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SEQ ID NO: 9 biotinilada durante 300 s a un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. El canal de referencia se cargó con reactivo de captura de biotina solamente.

45 Para demostrar la unión simultánea, se prepararon diluciones de hIL-17 A/F, hIL-23 y HSA (200 nM, 1000 nM y 2000 nM) en tampón HBS-EP+ suplementado con NaCl 350 mM y se aplicaron consecutivamente a la superficie del chip preparada. Aplicando un caudal de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, se inyectaron hIL-17 A/F, hIL-23 y HSA consecutivamente con un tiempo de contacto de la muestra de 300 s. La aplicación de la diana a la SEQ ID NO: 9 inmovilizada también se llevó a cabo empleando los ligandos individuales hIL-17 A/F, hIL-23 y HSA, para obtener los máximos niveles de unión obtenibles por unión a una única diana para comparación.

50 La figura 12 compara la curva de unión medida con una curva de unión teórica que refleja la unión completa de todos los ligandos. Esto último se obtuvo ensamblando la respuesta experimental de SEQ ID NO: 9 con los ligandos individuales. Las curvas medida y teórica son casi iguales, siendo la diferencia presentada atribuible a disociación de las dianas en la curva experimental. Los datos muestran que SEQ ID NO: 9 es capaz de unirse simultáneamente a todas las dianas, hIL-17A, hIL-23 y HSA, sin pérdida de intensidad de señal o un cambio en la cinética en comparación con la unión a una única diana solamente.

55 Ejemplo 13: Afinidad de muteínas de lipocalina alternativas por IL-23

60 Para medir la afinidad de unión de las muteínas de lipocalinas SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 a IL-23 humana, se empleó un ensayo basado en resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). En el ensayo de afinidad por SPR (figura 13), se inmovilizó hIL-23 sobre un chip sensor usando química de aminos convencional: La activación del chip, inmovilización de hIL-23, mediciones de SPR y evaluación de datos se llevaron a cabo tal como se describió en el ejemplo 6.

65 Tal como se muestra en la figura 13, las curvas de ajuste resultantes demuestran que la SEQ ID NO: 45 se unió con alta afinidad a hIL-23, con una constante de velocidad de asociación de $k_a = 3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y una constante de velocidad de disociación de $k_d = 3 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$, dando como resultado una constante de disociación de $K_D = 100 \text{ pM}$.

De manera similar, tal como se muestra en la figura 13, la SEQ ID NO: 46 se unió con alta afinidad a hIL-23, con una constante de velocidad de asociación de $k_a = 7,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y una constante de velocidad de disociación de $k_d = 4,0 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$, dando por resultado una constante de disociación de $K_D = 0,6 \text{ nM}$.

5 Ejemplo 14: Modo competitivo de acción de las muteínas de lipocalina para IL-23.

Se sometió a ensayo *in vitro* si las muteínas de lipocalinas SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 se unen a IL-23 humana de un modo competitivo usando un formato de ELISA de competición (figura 14). El experimento y la evaluación se llevaron a cabo de una manera idéntica en comparación con el ejemplo 8.

10 El resultado del experimento se muestra en la figura 14. La SEQ ID NO: 45 presenta una unión competitiva a hIL23, con un valor de CI50 ajustado de 0,1 nM, y la SEQ ID NO: 46 también presenta una unión competitiva a hIL23, con un valor de CI50 ajustado de 1,1 nM.

15 Ejemplo 15: Bloqueo de IL-23 mediado por muteínas de lipocalinas en ensayos de proliferación basados en células

La capacidad de las muteínas de lipocalina SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 para neutralizar la actividad biológica de hIL-23 se evaluó mediante la aplicación de bioensayos de proliferación a corto plazo empleando células que expresan de manera recombinante el receptor de IL-23 humano. El experimento y la evaluación se llevaron a cabo en analogía con el ejemplo 10. La SEQ ID NO: 43 sirvió como control negativo.

20 El resultado del experimento se muestra en la figura 15. La SEQ ID NO: 45 presenta una CE50 promedio de 3,7 nM, y la SEQ ID NO: 46 presenta una CE50 de 5,4 nM. El control negativo no tuvo efecto sobre la proliferación. Los datos demuestran por tanto que la SEQ ID NO: 2 y las muteínas de lipocalinas de SEQ ID NO: 45 y de SEQ ID NO: 46 presentan una potencia comparable en este ensayo funcional.

25 Ejemplo 16: Especificidad de la proteína de fusión hacia IL-17A

30 Se empleó un ensayo de ELISA para determinar la especificidad de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 63 y 62 para IL-17A. Se disolvió neutravidina en PBS (5 µg/ml) y se recubrió con la misma durante la noche una placa de microtitulación a 4°C. Se lavó la placa después de cada etapa de incubación con 100 µl de PBS suplementado con Tween 20 al 0,1% (v/v) (PBS-T) cinco veces. Se bloquearon las placas con BSA al 2% (p/v) en PBS-T (PBS-TB) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron. Se capturó IL-17A (Peprotech) que se había biotinilado sobre neutravidina durante 20 min a una concentración de 1 µg/ml. Se eliminó por lavado la proteína no unida. Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 o de la proteína de fusión a los pocillos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por una etapa de lavado. La proteína de fusión o muteína de lipocalina unidas se detectaron después de la incubación con anticuerpo anti-TLC humana diluido 1:2000 conjugado con HRP en PBS-TB. Después de una etapa de lavado adicional, se añadió sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Thermo) a cada pocillo y se detectó la intensidad de fluorescencia usando un lector de microplacas de fluorescencia.

35 El resultado del experimento se representa en la figura 16, junto con las curvas de ajuste resultantes de un ajuste sigmoideo de unión 1:1, en donde el valor de CE50 y la señal máxima fueron parámetros libres, y la pendiente se fijó a la unidad. Los valores de CE50 resultantes se proporcionan en la tabla 2, incluyendo los errores del ajuste sigmoideo de los datos. Los valores de CE50 observados son, dentro de los errores del experimento, muy similares para la proteína de fusión de anticuerpo-muteína de lipocalina y la muteína de lipocalina. El experimento muestra que la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 1 tal como se incluye en la proteína de fusión puede fusionarse al anticuerpo de SEQ ID NO: 61 y 62 sin pérdida en actividad hacia IL-17A.

50 Tabla 2 – Datos de ELISA para la unión a IL-17A

Nombre	CE50 IL-17A [nM]
SEQ ID NO: 1	1,14 ± 0,10
SEQ ID NO: 63 y 62	1,25 ± 0,17

55 Ejemplo 17: Especificidad de la proteína de fusión hacia IL-23

Se empleó un ensayo de ELISA para determinar la especificidad de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 64 y 62 hacia IL-23. Se disolvió neutravidina en PBS (5 µg/ml) y se recubrió con ella durante la noche una placa de microtitulación a 4°C. Se lavó la placa cinco veces después de cada etapa de incubación con 100 µl de PBS suplementado con Tween 20 al 0,1% (v/v) (PBS-T). Las placas se bloquearon con BSA al 2% (p/v) en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron. Se capturó IL-23 biotinilada sobre neutravidina durante 20 min a una concentración de

1 µg/ml. Se eliminó por lavado la proteína no unida. Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones de la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 o de las proteínas de fusión a los pocillos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por una etapa de lavado. La proteína de fusión o muteína de lipocalina unidas se detectaron después de la incubación con anticuerpo anti-NGAL humana diluido 1:1000 conjugado con HRP en PBS-T suplementado con BSA al 2% (p/v) (PBS-TB). Después de una etapa de lavado adicional, se añadió sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Thermo) a cada pocillo y se detectó la intensidad de fluorescencia usando un lector de microplacas de fluorescencia.

El resultado del experimento se representa en la figura 17, junto con las curvas de ajuste resultantes de un ajuste sigmoideo de unión 1:1, en donde el valor de CE50 y la señal máxima fueron parámetros libres, y la pendiente se fijó a la unidad. Los valores de CE50 resultantes se proporcionan en la tabla 3. Los valores de CE50 observados para la proteína de fusión anticuerpo-muteína de lipocalina y la muteína de lipocalina son muy similares dentro del error del experimento. Esto demuestra que la muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 2 tal como se incluye en la proteína de fusión puede fusionarse al anticuerpo de SEQ ID NO: 64 y 62 sin pérdida en actividad hacia IL-23.

Tabla 3 – Datos de ELISA para la unión a IL-23

Nombre	CE50 IL-23 [nM]
SEQ ID NO: 2	1,3 ± 0,08
SEQ ID NO: 64 y 62	1,2 ± 0,08

Ejemplo 18: Especificidad de proteínas de fusión hacia TNF- α

Se empleó un ensayo de ELISA para determinar la especificidad de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 63 y 62 y la proteína de fusión de SEQ ID NO: 64 y 62 para TNF- α . El anticuerpo de SEQ ID NO: 61 y 62 sirvió como control positivo. Se disolvió TNF- α recombinante (R&D Systems, 210-TA-100/CF) en PBS (1 µg/ml) y con el mismo se recubrieron durante la noche placas de microtitulación a 4°C. Se lavaron las placas cinco veces después de cada etapa de incubación con 100 µl de PBS-T. Las placas se bloquearon con BSA al 2% (p/v) en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron. Se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpo original específico para TNF- α o las proteínas de fusión a los pocillos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por una etapa de lavado. Las proteínas de fusión o anticuerpo unidos se detectaron después de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo Fab de cabra anti-IgG humana diluido 1:5000 conjugado con HRP (Jackson Laboratories) en PBS-TB. Después de una etapa de lavado adicional, se añadió sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Thermo) a cada pocillo y se detectó la intensidad de fluorescencia usando un lector de microplacas de fluorescencia.

El resultado del experimento se representa en la figura 18, junto con las curvas de ajuste que resultan de un ajuste sigmoideo de unión 1:1, en donde el valor de CE50 y la señal máxima eran parámetros libres, y la pendiente se fijó a la unidad. Se proporcionan los valores de CE50 resultantes en la tabla 4. Los valores de CE50 observados para todas las proteínas sometidas a ensayo son muy similares. Esto demuestra que el anticuerpo incluido en las proteínas de fusión puede fusionarse a diferentes muteínas de lipocalina sin comprometer su actividad hacia TNF- α .

Tabla 4 – Datos de ELISA para la unión a TNF- α

Nombre	CE50 TNF- α [nM]
SEQ ID NO: 61 y 62	0,16 ± 0,01
SEQ ID NO: 63 y 62	0,22 ± 0,01
SEQ ID NO: 64 y 62	0,26 ± 0,01

Ejemplo 19: Demostración de la unión simultánea a dianas de las proteínas de fusión en una configuración basada en ELISA

Con el objeto de demostrar la unión simultánea de la proteína de fusión de SEQ ID NO: 63 y 62 y la proteína de fusión de SEQ ID NO: 64 y 62 a TNF- α e IL-17A o IL-23, respectivamente, se usó un formato de ELISA de unión doble. Se recubrieron con TNF- α recombinante (R&D Systems, 210-TA-100/CF) en PBS (1 µg/ml) durante la noche placas de microtitulación a 4°C. Se lavó la placa cinco veces después de cada etapa de incubación con 100 µl de PBS-T. Se bloquearon las placas con BSA al 2% (p/v) en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron de nuevo. Se añadieron diferentes concentraciones de las proteínas de fusión a los pocillos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por una etapa de lavado. Posteriormente, se añadieron IL-17A biotinilada (en

caso de SEQ ID NO: 63 y 62) o IL-23 biotinilada (en caso de SEQ ID NO: 64 y 62) a una concentración constante de 1 µg/ml en PBS-TB durante 1 h. Después del lavado, se añadió Extravidin-HRP (Sigma-Aldrich, 1:5000 en PBS-TB) a los pocillos durante 1 h. Después de una etapa adicional de lavado, se añadió sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Thermo) a cada pocillo y se detectó la intensidad de fluorescencia usando un lector de microplacas de fluorescencia.

El resultado del experimento se representa en la figura 19, junto con las curvas de ajuste que resultan de un ajuste sigmoideo de unión 1:1, en donde el valor de CE50 y la señal máxima eran parámetros libres, y la pendiente se fijó a la unidad. Se proporcionan los valores de CE50 resultantes en la tabla 5. Todas las proteínas de fusión mostraron claras señales de unión con valores de CE50 en el intervalo de un dígito nanomolar, demostrando que las proteínas de fusión son capaces de unirse a TNF α y o bien a IL-17A o bien a IL-23 simultáneamente.

Tabla 5 – Datos de ELISA para la unión simultánea a dianas

Nombre	CE50 Unión doble [nM]
SEQ ID NO: 63 y 62	2,70 \pm 0,22
SEQ ID NO: 64 y 62	1,54 \pm 0,16

Las realizaciones descritas de manera ilustrativa en el presente documento pueden ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no específicamente dados a conocer en el presente documento. Así, por ejemplo las expresiones “que comprende”, “que incluye”, “que contiene”, etc. deben leerse de manera amplia y sin limitación. Además, cuando se describen características en cuanto a grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la divulgación también se describe de ese modo en cuanto a cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

Lista de secuencias

<110> Pieris AG

<120> POLIPÉPTIDOS DE UNIÓN ESPECÍFICA NOVEDOSOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> PIE15066PCT

<150> Documento EP 14169488.5

<151> 22-05-2014

<160> 68

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 151

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> muteína de lipocalina

<400> 1

ES 2 823 563 T3

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
 50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
 65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
 85 90 95

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
 100 105 110

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
 115 120 125

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
 130 135 140

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 2
 <211> 178
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> muteína de lipocalina

10 <400> 2

ES 2 823 563 T3

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

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

Asp Val Thr Arg Val Glu Phe Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Tyr Gln Ile
 65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly
 85 90 95

Ile Glu Ser Met Pro Gly Met Thr Ser Phe Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Ile Val Phe Phe Lys Tyr Val Tyr Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 3

<211> 351

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> proteína de fusión

10

<400> 3

ES 2 823 563 T3

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
 50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
 65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
 85 90 95

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
 100 105 110

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
 115 120 125

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
 130 135 140

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu
 165 170 175

Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly
 180 185 190

Lys Trp Tyr Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Leu Arg Glu Asp
 195 200 205

Lys Asp Pro Arg Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp
 210 215 220

ES 2 823 563 T3

Lys Ser Tyr Asp Val Thr Arg Val Glu Phe Gly Ala Lys Thr Tyr Lys
225 230 235 240

Tyr Gln Ile Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr
245 250 255

Leu Gly Gly Ile Glu Ser Met Pro Gly Met Thr Ser Phe Leu Val Arg
260 265 270

Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Ile Val Phe Phe Lys Tyr
275 280 285

Val Tyr Gln Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr
290 295 300

Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys
305 310 315 320

Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp
325 330 335

Gln Ala Ile Asp Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
340 345 350

<210> 4
<211> 349
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> proteína de fusión

<400> 4
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

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

Asp Val Thr Arg Val Glu Phe Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Tyr Gln Ile
65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly

ES 2 823 563 T3

<400> 5

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
100 105 110

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
115 120 125

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
130 135 140

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu
165 170 175

Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly
180 185 190

Lys Trp Tyr Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Leu Arg Glu Asp

ES 2 823 563 T3

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
100 105 110

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
115 120 125

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
130 135 140

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp
165 170 175

Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu
180 185 190

Glu Ser Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu
195 200 205

Glu Ala Lys Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys
210 215 220

Ala Val Leu Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly
225 230 235 240

Gly Lys His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr

ES 2 823 563 T3

Pro Ile Asp Gln Ala Ile Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ala
500 505 510

Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser
515 520 525

Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val
530 535 540

Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
545 550 555

<210> 7
<211> 240
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> proteína de fusión

10

<400> 7
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

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

Asp Val Thr Arg Val Glu Phe Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Tyr Gln Ile
65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly
85 90 95

Ile Glu Ser Met Pro Gly Met Thr Ser Phe Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Ile Val Phe Phe Lys Tyr Val Tyr Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

ES 2 823 563 T3

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
 130 135 140

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu
 145 150 155 160

Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly Val
 165 170 175

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly
 180 185 190

Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Ala Trp
 195 200 205

Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 210 215

<210> 9
 <211> 403
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> proteína de fusión

10

<400> 9
 Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
 50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
 65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
 85 90 95

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
 100 105 110

ES 2 823 563 T3

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
 115 120 125

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
 130 135 140

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu
 165 170 175

Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly
 180 185 190

Lys Trp Tyr Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Leu Arg Glu Asp
 195 200 205

Lys Asp Pro Arg Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp
 210 215 220

Lys Ser Tyr Asp Val Thr Arg Val Glu Phe Gly Ala Lys Thr Tyr Lys
 225 230 235 240

Tyr Gln Ile Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr
 245 250 255

Leu Gly Gly Ile Glu Ser Met Pro Gly Met Thr Ser Phe Leu Val Arg
 260 265 270

Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Ile Val Phe Phe Lys Tyr
 275 280 285

Val Tyr Gln Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr
 290 295 300

Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys
 305 310 315 320

Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp
 325 330 335

Gln Ala Ile Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys
 340 345 350

Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr
 355 360 365

Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu
 370 375 380

Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Ala Trp Ser His Pro Gln
 385 390 395 400

Phe Glu Lys

<211> 378
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> proteína de fusión

<400> 10

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
 50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
 65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
 85 90 95

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
 100 105 110

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
 115 120 125

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
 130 135 140

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160

10

ES 2 823 563 T3

Gly Gly Ser Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp
 165 170 175

Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu
 180 185 190

Glu Ser Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu
 195 200 205

Glu Ala Lys Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys
 210 215 220

Ala Val Leu Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly
 225 230 235 240

Gly Lys His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr
 245 250 255

Ile Phe Tyr Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp
 260 265 270

Leu Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe
 275 280 285

Glu Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile
 290 295 300

Pro Arg Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp Ser Gly Gly Gly
 305 310 315 320

Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser
 325 330 335

Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr
 340 345 350

Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 355 360 365

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 370 375

<210> 11
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> proteína de fusión

10

<400> 11

ES 2 823 563 T3

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

ES 2 823 563 T3

Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr
 245 250 255

Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val Thr Pro Met
 260 265 270

Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys Val Thr Met
 275 280 285

Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Lys Thr
 290 295 300

Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His Val Ala Tyr
 305 310 315 320

Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr Ser Glu Gly
 325 330 335

Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly Arg Asp Pro
 340 345 350

Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala Ala Gly Ala
 355 360 365

Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr
 370 375 380

Ser Ser Pro Gly Ser Asp
 385 390

<210> 12
 <211> 553
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> proteína de fusión

10

<400> 12
 Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
 20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

ES 2 823 563 T3

Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
100 105 110

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
115 120 125

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
130 135 140

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
165 170 175

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
180 185 190

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
195 200 205

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
210 215 220

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
225 230 235 240

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
245 250 255

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
260 265 270

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
275 280 285

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
290 295 300

ES 2 823 563 T3

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
305 310 315 320

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
325 330 335

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
340 345 350

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
355 360 365

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
370 375 380

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
405 410 415

Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
420 425 430

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
435 440 445

Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
450 455 460

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
465 470 475 480

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
485 490 495

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
500 505 510

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
515 520 525

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
530 535 540

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp
545 550

<210> 13
<211> 553
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> proteína de fusión

10 <400> 13

ES 2 823 563 T3

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

ES 2 823 563 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp
 225 230 235 240
 Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr
 245 250 255
 Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val Thr Pro Met
 260 265 270
 Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys Val Thr Met
 275 280 285
 Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Lys Thr
 290 295 300
 Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His Val Ala Tyr
 305 310 315 320
 Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr Ser Glu Gly
 325 330 335
 Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly Arg Asp Pro
 340 345 350
 Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala Ala Gly Ala
 355 360 365
 Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr
 370 375 380
 Ser Ser Pro Gly Ser Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 385 390 395 400
 Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 405 410 415
 Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
 420 425 430
 Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 435 440 445
 Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
 450 455 460

ES 2 823 563 T3

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
465 470 475 480

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser Arg Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
485 490 495

Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
500 505 510

Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
515 520 525

Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
530 535 540

Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asp
545 550

<210> 14
<211> 55
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> dominio de unión a albúmina

10 <400> 14
Ser Ala Gly Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu
1 5 10 15

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

Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp
35 40 45

Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
50 55

15 <210> 15
<211> 52
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> dominio de unión a albúmina

<400> 15
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala

ES 2 823 563 T3

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

5 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> etiqueta de proteína

<400> 17
 Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5 10

15 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> ligador sintético

<400> 18
 Ser Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

25 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> ligador sintético

<400> 19
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

35 <210> 20
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> ligador sintético

45 <400> 20
 Ser Asp
 1

<210> 21

ES 2 823 563 T3

<211> 453
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> muteína de lipocalina

<400> 21
 gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
 gatttttggg gttctgggat tcatgaggag tctgttacgc caatgactct gactaccctt 120
 gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattg agggatttct tcaagagttt 180
 aaggcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaaccat 240
 gttgcctata tcattcgagc ccgtgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggagat 300
 tgtcctggtc cggttccagg ggtgtggctc gtgggcagag accccaagaa caacctggaa 360
 gccttgaggg actttgagaa agccgcagga gcccgcgac tcagcacgga gagcatcctc 420
 atccccaggc agagcgaaac cagctctcca ggg 453

10 <210> 22
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> muteína de lipocalina

<400> 22
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120
 ttgctgctg aggataagga tccgaggaaa atgacggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atgacgtcac ccgggtggag tttggggcta agacatacaa gtaccagatt 240
 gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat tgaaagtatg 300
 ccgggcatga catcattttt ggtccgtgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccata 360
 20 gtgttcttca agtatgtgta tcagaaccgc gagtattttg agatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc aggctatcga cggc 534

25 <210> 23
 <211> 1053
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> proteína de fusión

<400> 23

ES 2 823 563 T3

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
gatttttggg gttctgggat tcatgaggag tctgttacgc caatgactct gactaccctt 120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattg agggatttct tcaagagttt 180
aaggcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggtaaacat 240
gttgccata tcattcgag ccgtgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgaggagat 300
tgtcctggtc cggttccagg ggtgtggctc gtgggcagag accccaagaa caacctgga 360
gccttgaggg actttgagaa agccgcagga gcccgcgac tcagcacgga gagcatcctc 420
atcccaggc agagcgaaac cagctctcca gggagcgac gtggtggtgg ttctggtggt 480
ggtggatcgc aggactccac ctcagacctg atcccagccc cacctctgag caaggccct 540
ctgcagcaga acttccagga caaccaattc catgggaaat ggtatgtcgt gggcgaggcc 600
ggaaatcttt tgctcgtga ggataaggat cggaggaaaa tgacggcgac catttacgag 660
ttgaaagaag ataaatcata tgacgtcacc cgggtggagt ttggggctaa gacatacaag 720
taccagattg ggacctttgt gccggggagc cagccgggag agtttacttt aggcggtatt 780
gaaagtatgc cgggcatgac atcatttttg gtccgtgtcg tgagcaccaa ctacaaccag 840
catgccatag tgttcttcaa gtatgtgtat cagaaccgag agtattttga gatcacactg 900
tacgggcgca cgaagaact gacaagcgag ctgaaggaaa attttatccg cttttccaaa 960
tctctgggcc tccctgaaaa ccacatcgtc ttccctgtcc caatcgacca ggctatcgac 1020
ggcagcgctt ggtctcacc gcagttcgaa aaa 1053

<210> 24
<211> 1047
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> proteína de fusión

<400> 24
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggctcc tctgcagcag 60

ES 2 823 563 T3

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgctg tgggcgaggc cggaaatctt 120
 ttgctgctg aggataagga tccgaggaaa atgacggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atgacgtcac ccgggtggag tttggggcta agacatacaa gtaccagatt 240
 gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat tgaaagtatg 300
 ccgggcatga catcattttt ggtccgtgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccata 360
 gtgttcttca agtatgtgta tcagaaccgc gagtattttg agatcacact gtacgggctgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgctc ccaatcgacc aggctatcga cggcgccggt 540
 ggtggttctg gtggtggtg atcggcctca gacgaggaga ttcaggatgt gtcagggacg 600
 tggatatctga agcccatgac ggtggatttt tgggttctg ggattcatga ggagtctgtt 660
 acgccaatga ctctgactac ccttgaaggc ggcaatctgg aggctaaggt caccatggat 720
 attgagggat ttcttcaaga gtttaaggca gtgttagaga agacagatga accgggtaaa 780
 tatacgccg atggcggtaa acatgttgcc tatatcattc gcagccgtgt gaaagatcat 840
 tacatctttt atagcgaggg agattgtcct ggtccggttc caggggtgtg gctcgtgggc 900
 agagaccca agaacaacct ggaagccttg gaggactttg agaaagccgc aggagcccgc 960
 ggactcagca cggagagcat cctcatcccc aggcagagcg aaaccagctc tccagggagc 1020
 gcttggctc acccgcagtt cgaaaaa 1047

<210> 25
 <211> 1218
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> proteína de fusión

10

<400> 25
 gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
 gatttttggg gttctgggat tcatgaggag tctgttacgc caatgactct gactaccctt 120
 gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattg agggatttct tcaagagttt 180
 aaggcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggtaaacat 240
 gttgcctata tcattcgcag ccgtgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggagat 300
 tgtcctggtc cggttccagc ggtgtggctc gtgggcagag accccaagaa caacctggaa 360
 gccttgaggg actttgagaa agccgcagga gcccgcgac tcagcacgga gagcatcctc 420
 atcccaggc agagcgaaac cagctctcca gggagcgacg gtggtggtg ttctggtggt 480
 ggtggatcgc aggactccac ctccagacct atcccagccc cacctctgag caaggtccct 540
 ctgcagcaga acttccagga caaccaattc catgggaaat ggtatgtcgt gggcgaggcc 600

ES 2 823 563 T3

ggaaatcttt tgctgctga ggataaggat ccgaggaaaa tgacggcgac cattedacgag 660
 ttgaaaagaag ataaatcata tgacgtcacc cgggtggagt ttggggctaa gacatacaag 720
 taccagattg ggacctttgt gccggggagc cagccgggag agtttacttt aggcggtatt 780
 gaaagtatgc cgggcatgac atcatttttg gtccgtgtcg tgagcaccaa ctacaaccag 840
 catgccatag tgttcttcaa gtatgtgtat cagaaccgag agtattttga gatcacactg 900
 tacgggagca cgaagaact gacaagcgag ctgaaggaaa attttatccg cttttccaaa 960
 tctctgggccc tccctgaaaa ccacatcgtc ttccctgtcc caatcgacca ggctatcgac 1020
 ggcagcgtg gtgccgtcga cgctaactct ctggctgaag ctaaagtctt ggctaaccgt 1080
 gaactggaca aatcgggtgt ttccgactac taaaaaac tcatcaaca cgctaaaacc 1140
 gttgaaggtg ttaaagctct gatcgacgaa attctcgcag cactgccgag cgcttggctt 1200
 caccgcagt tcgaaaaa 1218

<210> 26
 <211> 1671
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> proteína de fusión

10

<400> 26
 gcaagtgatg aagaaattca ggatgttagc ggcacctggt atctgaaagc aatgaccggt 60
 gatttttggg gcagcgggat tcatgaagaa agcgttacc cgatgaccct gaccaccctg 120
 gaaggtggta atctggaagc aaaagttacc atggatattg agggttttct gcaagaattt 180
 aaagccgtgc tggaaaaaac cgatgaaccg ggtaaataata ccgcagatgg tggtaaacat 240
 gtggcctata ttatccgtag ccgtgtgaaa gatcactata tcttttatag cgaaggtgat 300
 tgtccggggtc cggttccggg tgtttggctg gttggtcgtg atccgaaaaa taacctggaa 360
 gcactggaag attttgaaaa agcagccggt gcacgtggtc tgagcaccga aagcattctg 420
 attccgcgtc agagcgaaac cagcagtcct ggatccgacg gtggtggtgg ttctggtggt 480
 ggtggtatcg cctcagacga ggagattcag gatgtgtcag ggacgtggtg tctgaaggcc 540
 atgacggtgg atttttggtg ttctgggatt catgaggagt ctgttacgcc aatgactctg 600
 actacccttg aagcgggcaa tctggaggct aaggtcacca tggatattga gggatttctt 660
 caagagttta agcagtggtt agagaagaca gatgaaccgg gtaaataatac ggccgatggc 720
 ggtaaacatg ttgcctatat cattcgcagc cgtgtgaaag atcattacat cttttatagc 780
 gagggagatt gtccctggtc ggttcagggt gtgtggctcg tgggcagaga cccaagaac 840
 aacctggaag ccttggagga ctttgagaaa gccgcaggag cccgcggact cagcacggag 900

ES 2 823 563 T3

agcatcctca tccccaggca gagcgaaacc agctctccag ggagcgacgg cggaggtggc 960
 tcaggaggtg gcggatccca ggactccacc tcagacctga tcccagcccc acctctgagc 1020
 aaggtccctc tgcagcagaa cttccaggac aaccaattcc atgggaaatg gtatgtcgtg 1080
 ggcgaggccg gaaatctttt gctgctgag gataaggatc cgaggaaaat gacggcgacc 1140
 atttacgagt tgaagaaga taaatcatat gacgtcaccg ggggtggagt tggggctaag 1200
 acatacaagt accagattgg gacctttgtg ccggggagcc agccgggcca gtttacttta 1260
 ggcggtattg aaagtatgcc gggcatgaca tcatTTTTTg tccgtgtcgt gagcaccaac 1320
 tacaaccagc atgccatagt gttcttcaag tatgtgtatc agaaccgca gtattttgag 1380
 atcacactgt acggggcgac gaaagaactg acaagcgagc tgaaggaaaa ttttatccgc 1440
 ttttccaaat ctctgggcct ccctgaaaac cacatcgtct tccctgtccc aatcgaccag 1500
 gctatcgacg gcagcggcgg cggcggctct ctggctgaag ctaaagaagc ggctaacgag 1560
 gaactggact cttacggtgt ttccgacttt tacaacgctc tcatcgataa agctaaaacc 1620
 gttgaaggtg ttgaagctct gaaagacgag attctcgcag cactgccgaa a 1671

5 <210> 27
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> proteína de fusión

<400> 27
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcgt tggcgaggc cggaaatctt 120
 ttgctgctg aggataagga tccgaggaaa atgacggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atgacgtcac ccgggtggag tttggggcta agacatacaa gtaccagatt 240
 gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat tgaaagtatg 300
 ccgggcatga catcattttt ggtccgtgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccata 360
 gtgttcttca agtatgtgta tcagaaccgc gagtattttg agatcacact gtacggcgcg 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatTTTatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc aggctatcga cggcagcggc 540
 ggcggcggct ctctggctga agctaaagaa gcggctaacg cggaactgga ctcttacggt 600
 gtttccgact tttacaaacg tctcatcgat aaagctaaaa ccggtgaagg tgttgaagct 660
 ctgaaagacg cgattctcgc agcactgccg agcgcttggc ctcaaccgca gttcgaaaaa 720

15 <210> 28
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> proteína de fusión

<400> 28

ES 2 823 563 T3

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
gatttttggg gttctgggat tcatgaggag tctgttacgc caatgactct gactaccctt 120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattg agggatttct tcaagagttt 180
aaggcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggtaaacad 240
gttgccctata tcattcgcag ccgtgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggagat 300
tgtcctggtc cggttccagg ggtgtggctc gtgggcagag accccaagaa caacctggaa 360
gccttgaggg actttgagaa agccgcagga gcccgcgac tcagcacgga gagcatcctc 420
atccccaggc agagcgaaac cagctctcca gggagcgata gcggcggcgg cggctctctg 480
gctgaagcta aagaagcggc taacgcgaa ctggactctt acggtgtttc cgacttttac 540
aaacgtctca tcgataaagc taaaaccgtt gaaggtgttg aagctctgaa agacgcgatt 600
ctcgcagcac tgcggagcgc ttggtctcac ccgcagttcg aaaaa 645

<210> 29
<211> 1209
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> proteína de fusión

<400> 29
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
gatttttggg gttctgggat tcatgaggag tctgttacgc caatgactct gactaccctt 120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattg agggatttct tcaagagttt 180
aaggcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggtaaacad 240
gttgccctata tcattcgcag ccgtgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggagat 300
tgtcctggtc cggttccagg ggtgtggctc gtgggcagag accccaagaa caacctggaa 360
gccttgaggg actttgagaa agccgcagga gcccgcgac tcagcacgga gagcatcctc 420
atccccaggc agagcgaaac cagctctcca gggagcgacg gcggagggtg ctcaggagggt 480
ggcggatccc aggactccac ctcagacctg atcccagccc cacctctgag caaggtccct 540
ctgcagcaga acttccagga caaccaattc catgggaaat ggtatgtcgt gggcgaggcc 600
ggaaatcttt tgctgcgtga ggataaggat ccgaggaaaa tgacggcgac catttacgag 660
ttgaaagaag ataaatcata tgacgtcacc cgggtggagt ttggggctaa gacatacaag 720

ES 2 823 563 T3

taccagattg ggacctttgt gccggggagc cagccgggag agtttacttt aggcggtatt 780
 gaaagtatgc cgggcatgac atcatttttg gtccgtgtcg tgagcaccaa ctacaaccag 840
 catgccatag tgttcttcaa gtatgtgtat cagaaccgag agtattttga gatcacactg 900
 tacgggcgca cgaagaact gacaagcgag ctgaaggaaa attttatccg cttttccaaa 960
 tctctgggcc tccctgaaaa ccacatcgtc ttccctgtcc caatcgacca ggctatcgac 1020
 ggcagcggcg gcggcggctc tctggctgaa gctaaagaag cggctaaccg ggaactggac 1080
 tcttacggtg tttccgactt ttacaaacgt ctcatcgata aagctaaaac cgttgaagggt 1140
 gttgaagctc tgaagacgc gattctcgca gcaactgccg gcgcttggtc tcacccgcag 1200
 ttcgaaaaa 1209

5 <210> 30
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> proteína de fusión

<400> 30
 gcaagtgatg aagaaattca ggatgtagc ggcacctggt atctgaaagc aatgaccggt 60
 gatttttggt gcagcgggat tcatgaagaa agcgttacc cgatgaccct gaccaccctg 120
 gaagtggtta atctggaagc aaaagttacc atggatattg agggttttct gcaagaattt 180
 aaagccgtgc tggaaaaaac cgatgaaccg ggtaaatata ccgcagatgg tggtaaacat 240
 gtggcctata ttatccgtag ccgtgtgaaa gatcactata tcttttatag cgaagtgat 300
 tgtccgggtc cggttccggg tgtttggctg gttggtcgtg atccgaaaaa taacctggaa 360
 gcactggaag attttgaaaa agcagccggt gcacgtggtc tgagcaccga aagcattctg 420
 attccgcgtc agagcgaaac cagcagtcct ggatccgacg gtggtggtgg ttctggtggt 480
 ggtggtatcg cctcagacga ggagattcag gatgtgtcag ggacgtggtta tctgaagccc 540
 atgacggtgg atttttggtg ttctgggatt catgaggagt ctgttacgcc aatgactctg 600
 actacccttg aaggcggcaa tctggaggct aaggtcacca tggatattga gggatttctt 660
 caagagtta aggcagtgtt agagaagaca gatgaaccgg gtaaatatac ggccgatggc 720
 ggtaaacatg ttgcctatat cattcgcagc cgtgtgaaag atcattacat cttttatagc 780
 gagggagatt gtccctggtc gggtccaggg gtgtggctcg tgggcagaga cccaagaac 840
 aacctggaag ccttgaggga ctttgagaaa gccgcaggag cccgcggact cagcacggag 900
 agcatcctca tccccaggca gagcgaacc agctctccag ggagcgatag cggcggcggc 960
 ggctctctgg ctgaagctaa agaagcggct aacgcggaac tggactctta cgggtgttcc 1020
 gacttttaca aacgtctcat cgataaagct aaaaccggtg aaggtgttga agctctgaaa 1080
 gacgcgattc tcgcagcact gccgagcgtc tggctcacc cgcagttcga aaaa 1134

15 <210> 31
 <211> 1173
 <212> ADN
 <213> artificial

20

ES 2 823 563 T3

<220>

<223> proteína de fusión

<400> 31

```

gacaaaaacc acacctgccc accttgtcct gccctgaac tgctgggagg accttctgtg      60
tttctgttcc caccaaaacc aaaagatacc ctgatgatct ctagaacccc tgaggtgaca      120
tgtgtggtgg tggatgtgtc tcatgaggac cctgaggtca aattcaactg gtacgtggat      180
ggagtggaag tccacaatgc caaaaccaag cctagagagg aacagtacaa ttcaacctac      240
agagtggta caagtgtgac tgtgctgcat caggattggc tgaatggcaa ggaatacaag      300
tgtaaagtct caaacaaggc cctgcctgct ccaattgaga aaacaatctc aaaggccaag      360
ggacagccta ggaaccccca ggtctacacc ctgccacctt caagagagga aatgaccaa      420
aaccaggtgt cctgacatg cctggtaaaa ggcttctacc cttctgacat tgctgtggag      480
tgggagtcaa atggacagcc tgagaacaac tacaaaacaa cccccctgt gctggattct      540
gatggctctt tctttctgta ctccaaactg actgtggaca agtctagatg gcagcagggg      600
aatgtctttt cttgctctgt catgcatgag gctctgcata accactacac tcagaaatcc      660
ctgtctctgt ctccctggca aggcggcgga ggatccggcg gaggaggtag cgcacagac      720
gaggaaatcc aggacgtgtc agggacctgg tacctgaaag ccatgaccgt ggatttttgg      780
tgctccggca tccatgagga gtcagtcact cccatgacct tgacaaccct agaaggtggg      840
aatctggagg ccaaagtgac aatggatatt gagggtttc tccaggagt caaagccgtc      900
ctcgagaaga cagacgagcc tggaaagtat actgctgatg ggggaaaaca cgtagcctat      960
atcattcgat ctccgggtgaa ggatcattat atcttctatt ccgagggcga ctgccccggc     1020
cctgtgccag gtgtctggct agttgggagg gacccaaga acaatctcga ggctctggag     1080
gacttcgaga aggcagctgg tgccagggga ttgagcactg agtctatcct tatcccacgc     1140
5  cagagcgaga cctcaagccc aggggtccgac tga                                     1173

```

<210> 32

<211> 1659

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> proteína de fusión

15 <400> 32

ES 2 823 563 T3

gcatcagacg aggaaatcca ggacgtgtca gggacctggt acctgaaagc catgaccgtg 60
gatttttggg gctccggcat ccatgaggag tcagtcactc ccatgaccct gacaacccta 120
gaaggtggga atctggaggc caaagtgaca atggatattg agggctttct ccaggagttc 180
aaagccgtcc tcgagaagac agacgagcct ggaaagtata ctgctgatgg gggaaaacac 240
gtagcctata tcattcgatc tcgggtgaag gatcattata tcttctattc cgagggcgac 300
tgccccggcc ctgtgccagg tgtctggcta gttgggaggg accccaagaa caatctcgag 360
gctctggagg acttcogagaa ggcagctggt gccaggggat tgagcactga gtctatcctt 420
atcccacgcc agagcgagac ctcaagccca gggcccgacg gcggtggagg atccggtgga 480
ggcggttctg acaaaaccca cacctgccca ccttgtcctg cccctgaact gctgggagga 540
ccttctgtgt ttctgttccc accaaaacca aaagataccc tgatgatctc tagaacccct 600
gaggtgacat gtgtggtggt ggatgtgtct catgaggacc ctgaggtcaa attcaactgg 660
tacgtggatg gagtggaagt ccacaatgcc aaaaccaagc ctagagagga acagtacaat 720
tcaacctaca gagtggctag tgtgctgact gtgctgcac aggattggct gaatggcaag 780
gaatacaagt gtaaagtctc aaacaaggcc ctgcctgctc caattgagaa aacaatctca 840
aaggccaagg gacagcctag ggaacccag gtctacaccc tgccaccttc aagagaggaa 900
atgacaaaaa accaggtgct cctgacatgc ctggtcaaag gcttctaccc ttctgacatt 960
gctgtggagt gggagtcaaa tggacagcct gagaacaact acaaaacaac cccccctgtg 1020
ctggattctg atggtccttt ttttctgtac tccaaactga ctgtggacaa gtctagatgg 1080
cagcagggga atgtcttttc ttgctctgtc atgcatgagg ctctgcataa ccactacact 1140
cagaaatccc tgtctctgtc tcccgggaaa gggggtgggg gatccggcgg aggaggtagc 1200
gcatcagacg aggaaatcca ggacgtgtca gggacctggt acctgaaagc catgaccgtg 1260
gatttttggg gctccggcat ccatgaggag tcagtcactc ccatgaccct gacaacccta 1320
gaaggtggga atctggaggc caaagtgaca atggatattg agggctttct ccaggagttc 1380
aaagccgtcc tcgagaagac agacgagcct ggaaagtata ctgctgatgg gggaaaacac 1440
gtagcctata tcattcgatc tcgggtgaag gatcattata tcttctattc cgagggcgac 1500
tgccccggcc ctgtgccagg tgtctggcta gttgggaggg accccaagaa caatctcgag 1560
gctctggagg acttcogagaa ggcagctggt gccaggggat tgagcactga gtctatcctt 1620
atcccacgcc agagcgagac ctcaagccca gggcccgac 1659

<210> 33
<211> 1659
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> proteína de fusión

<400> 33

ES 2 823 563 T3

gacaaaaacc acacctgccc accttgtcct gccctgaac tgctgggag accttctgtg 60
 tttctgttcc caccaaaacc aaaagatacc ctgatgatct ctagaacccc tgaggtgaca 120
 tgtgtggtgg tggatgtgtc tcatgaggac cctgaggta aattcaactg gtacgtggat 180
 ggagtggaag tccacaatgc caaaaccaag cctagagagg aacagtacaa ttcaacctac 240
 agagtggca gtgtgctgac tgtgctgcat caggattggc tgaatggcaa ggaatacaag 300
 tgtaaagtct caaacaaggc cctgcctgct ccaattgaga aaacaatctc aaaggccaag 360
 ggacagccta gggaaaccca ggtctacacc ctgccacctt caagagagga aatgaccaa 420
 aaccaggtgt ccctgacatg cctggcctaaa ggcttctacc cttctgacat tgctgtggag 480
 tgggagtcaa atggacagcc tgagaacaac taaaaaaca cccccctgt gctggattct 540
 gatggctctt tctttctgta ctccaaactg actgtggaca agtctagatg gcagcagggg 600
 aatgtctttt ctgtctctgt catgcatgag gctctgcata accactacac tcagaaatcc 660
 ctgtctctgt ctccctggcaa aggcggcggg ggatccggcg gaggaggtag cgcacagac 720
 gaggaaatcc aggacgtgtc agggacctgg tacctgaaag ccatgaccgt ggatttttgg 780
 tgctccggca tccatgagga gtcagtcact cccatgaccc tgacaaccct agaaggtggg 840
 aatctggagg ccaaagtgc aatggatatt gagggctttc tccaggagt caaagccgtc 900
 ctcgagaaga cagacgagcc tggaaagtat actgctgatg ggggaaaaca cgtagcctat 960
 atcattcgat ctccgggtgaa ggatcattat atcttctatt ccgagggcga ctgccccggc 1020
 cctgtgccag gtgtctggct agttgggagg gaccccaaga acaatctcga ggctctggag 1080
 gacttcgaga aggcagctgg tgccagggga ttgagcactg agtctatcct tatcccacgc 1140
 cagagcgaga cctcaagccc agggctccgac ggcggcgggt ggccggcg cggtggctcc 1200
 gcgtccgatg aagaaatcca ggatgtgagc ggcacctgg atctgaaagc aatgaccgtt 1260
 gacttctggg gctccggcat ccatgaagaa agcgtgaccc caatgacctt gaccacgctg 1320
 gaagcggtg atttagaagc caaagtaact atggatatcg aaggcttctc gcaggaattt 1380
 aaagcgggtc tggaaaaaac tgatgagcca ggtaaataca ccgccgacgg tggcaaacac 1440
 gtggcctata ttatccgttc tcgtgtcaaa gaccattata tcttctactc tgaagcgat 1500
 tgccccggtc cggttccggg cgtctggctt gtcggtcgtg acccgaaaa caacctggaa 1560
 gcactcgaag acttcgaaaa agcggcaggc gcgcgtggtc tgtctaccga gagcatcctt 1620
 atcccacgtc agagcgaaac ctccagccct ggttccgat 1659

<210> 34
 <211> 165
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> dominio de unión a albúmina

10

<400> 34
 agcgtgggtg ccgtgcagc taactctctg gctgaagcta aagttctggc taacctgaa 60
 ctggacaaat acggtgtttc cgactactac aaaaacctca tcaacaacgc taaaacctt 120
 gaaggtgtta aagctctgat cgacgaaatt ctgcgacac tgccg 165

ES 2 823 563 T3

<210> 35
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> dominio de unión a albúmina

 <400> 35
 agcggcggcg gcggtctctt ggctgaagct aaagaagcgg ctaacgcgga actggactct 60
 tacgggtgttt ccgactttta caaacgtctc atcgataaag ctaaaaccgt tgaaggtgtt 120
 10 gaagctctga aagacgcgat tctcgcagca ctgccg 156

 <210> 36
 <211> 681
 <212> ADN
 15 <213> artificial

 <220>
 <223> Porción de Fc
 20
 <400> 36
 gacaaaaacc acacctgccc accttgtcct gccctgaac tgctgggagg accttctgtg 60
 tttctgttcc caccaaaacc aaaagatacc ctgatgatct ctagaacccc tgaggtgaca 120
 tgtgtggtgg tggatgtgtc tcatgaggac cctgaggtca aattcaactg gtacgtggat 180
 ggagtggaag tccacaatgc caaaaccaag cctagagagg aacagtaca ttcaacctac 240
 agagtggca gtgtgctgac tgtgctgcat caggattggc tgaatggcaa ggaatacaag 300
 tgtaaagtct caaacaaggc cctgcctgct ccaattgaga aaacaatctc aaaggccaag 360
 ggacagccta ggaacccca ggtctacacc ctgccacctt caagagagga aatgaccaa 420
 aaccaggtgt cctgacatg cctggcaca ggcttctacc cttctgacat tgctgtggag 480
 tgggagtcaa atggacagcc tgagaacaac taaaaaaa cccccctgt gctggattct 540
 gatggctctt tctttctgta ctccaaactg actgtggaca agtctagatg gcagcagggg 600
 aatgtctttt cttgctctgt catgcatgag gctctgcata accactacac tcagaaatcc 660
 ctgtctctgt ctctggcaa g 681

 <210> 37
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> etiqueta de proteína
 30
 <400> 37
 agcgcttggg ctcaccgca gttcgaaaa 30

 <210> 38
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 40 <223> ligador sintético

ES 2 823 563 T3

<400> 38
agcgacgggtg gtggtgggtc tgggtggtg g gatcg 36

5 <210> 39
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> ligador sintético

<400> 39
ggtgggtggg gttctggtgg tgggtgatcg 30

15 <210> 40
<211> 6
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> ligador sintético

<400> 40
agcgac 6

25 <210> 41
<211> 152
<212> PRT
<213> humano

30 <400> 41
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15
Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met Asn Leu Glu Ser Val
20 25 30
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45
Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Cys Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60
Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80
Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95
Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Arg Gly Val Lys Leu Val
100 105 110
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140
Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly
145 150

ES 2 823 563 T3

<210> 42
 <211> 151
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> muteína de lipocalina

 10 <400> 42
 Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

 Ala Met Thr Val Asp Phe Trp Cys Ser Gly Ile His Glu Glu Ser Val
 20 25 30

 Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45

 Val Thr Met Asp Ile Glu Gly Phe Leu Gln Glu Phe Lys Ala Val Leu
 50 55 60

 Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
 65 70 75 80

 Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
 85 90 95

 Ser Glu Gly Asp Cys Pro Gly Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val Gly
 100 105 110

 Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala
 115 120 125

 Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln
 130 135 140

 Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

 15 <210> 43
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> humano

 <400> 43

ES 2 823 563 T3

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile
 65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Cys Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
 85 90 95

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

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 44
 5 <211> 178
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> muteína de lipocalina

<400> 44

ES 2 823 563 T3

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

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

Asn Val Thr Arg Val Glu Phe Gly Val Lys Thr Tyr Lys Tyr Gln Ile
 65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly
 85 90 95

Ile Lys Ser Met Pro Gly Met Thr Ser Phe Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Tyr Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile
 165 170 175

Asp Gly

5 <210> 45
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> muteína de lipocalina

<400> 45

ES 2 823 563 T3

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

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

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

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly
 85 90 95

Ile Lys Ser Met Pro Gly Met Thr Ser Phe Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Tyr Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 46

<211> 178

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> muteína de lipocalina

10

<400> 46

ES 2 823 563 T3

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

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45

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

Asp Val Thr Arg Val Glu Phe Gly Val Lys Thr Tyr Lys Tyr Gln Ile
 65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly
 85 90 95

Ile Lys Ser Met Pro Gly Met Thr Ser Phe Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asp Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Tyr Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 47

<211> 456

5 <212> ADN

<213> humano

<400> 47

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gacagggagt tcctgagat gaatctggaa tcggtgacac ccatgaccct caccgacctg 120

gaagggggca acctggaagc caaggtcacc atgtgataa gtggccggtg ccaggaggtg 180

aaggccgtcc tggagaaaac tgacgagccg ggaaaataca cggccgacg gggcaagcac 240

gtggcataca tcatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tcttttactg tgagggcgag 300

ctgcacggga agccggtccg aggggtgaag ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggg 456

10

<210> 48

<211> 453

<212> ADN

ES 2 823 563 T3

<213> artificial

<220>

<223> proteína de lipocalina

5

<400> 48

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gatttttggg gttctgggat tcatgaggag tctgttacgc caatgactct gactaccctt      120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattg agggatttct tcaagagttt      180
aaggcagtgtagagaagac agatgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggtaaacat      240
gttgcttata tcattcgcag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggagat      300
tgtcctggtc cggttccagg ggtgtggctc gtgggcagag accccaagaa caacctggaa      360
gccttgaggg actttgagaa agccgcagga gcccgcgac tcagcacgga gagcatcctc      420
atccccaggc agagcgaaac cagctctcca ggg                                     453
```

<210> 49

10

<211> 534

<212> ADN

<213> humano

<400> 49

```
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag      60
aacttccagg acaaccaatt ccaggggaag tggatgtgg taggcctggc agggaatgca      120
attctcagag aagacaaaga cccgcaaaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa      180
gacaagagct acaatgtcac ctccgtcctg ttaggaaaa agaagtgtga ctactggatc      240
aggacttttg ttccaggttg ccagcccggc gagttcacgc tgggcaacat taagagttac      300
cctggattaa cgagttacct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg      360
gtgttcttta agaaagtttc tcaaacaggg gagtacttca agatcacctc ctacgggaga      420
accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctcaa atctctgggc      480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc          534
```

20

<210> 50

<211> 534

<212> ADN

<213> artificial

<220>

25

<223> proteína de lipocalina

<400> 50

ES 2 823 563 T3

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgctg tgggcgaggc cggaaatctt 120
 ttgctgcgtg aggataagga tccgagaaa atgacggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac ccgggtggag tttgggggta agacatacaa gtaccagatt 240
 gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtatg 300
 ccgggcatga catcattttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgttcttca agtatgtgta tcagaaccgc gagtattttg agatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc aggctatcga cggc 534

5 <210> 51
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> muteína de lipocalina

<400> 51
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag taggtgaggc cggaaatctg 120
 attctgcgtg aggataagga tccgagaaaa atgactgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat atgacgtcac cagggtggag tttgggggta agacgcgtaa gtaccggatt 240
 gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtatg 300
 ccgggcatga catcattttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgttcttca agtagctgta tcagaaccgc gagtattttg agatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc aggctatcga cggc 534

15 <210> 52
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> muteína de lipocalina

<400> 52

ES 2 823 563 T3

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgctg tgggcgaggc cggaaatctt 120
 ttgctgcgtg aggataagga tccgaggaaa atgacggcga ccatttacga gttgagagaa 180
 gataaatcat atgacgtcac ccgggtggag tttgggggta agacatacaa gtaccagatt 240
 gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtatg 300
 ccgggcatga catcattttt ggtccgcgtc gtgagcaccg actacaacca gcatgccatg 360
 gtgttcttca agtatgtgta tcagaaccgc gagtattttg agatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gttgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc aggctatcga cggc 534

<210> 53
 <211> 457
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> cadena pesada del anticuerpo de referencia

10

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr Trp

ES 2 823 563 T3

	100							105							110
Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
		115					120					125			
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
	130					135					140				
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
145					150					155					160
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
				165					170					175	
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
			180					185					190		
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
		195					200						205		
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
	210					215					220				
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
225					230					235					240
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
				245					250						255
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
			260					265						270	
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
		275					280					285			
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
	290					295					300				
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
305					310					315					320
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
				325					330					335	
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
			340					345					350		

ES 2 823 563 T3

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 54
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> cadena ligera del anticuerpo de referencia

10

<400> 54
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

ES 2 823 563 T3

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 55
<211> 446
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> cadena pesada del anticuerpo de referencia

<400> 55
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Val Ile Asn Pro Glu Tyr Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

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

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

ES 2 823 563 T3

Ala Arg Tyr Asp Tyr Phe Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

ES 2 823 563 T3

340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 56
<211> 219
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> cadena ligera del anticuerpo de referencia

<400> 56
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

Arg Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

ES 2 823 563 T3

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

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

<210> 57
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada del anticuerpo de referencia

10

<400> 57
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Ile Gly Thr Gly Tyr Thr Glu Pro Asn Pro Lys Tyr
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

ES 2 823 563 T3

Ala Thr Ile Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Phe Asp Gln Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

ES 2 823 563 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 58
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> cadena ligera del anticuerpo de referencia

10

<400> 58
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

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

Gly Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Gln Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

ES 2 823 563 T3

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

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

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

<210> 59
 <211> 447
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> cadena pesada del anticuerpo de referencia

<400> 59
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

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

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

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

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

ES 2 823 563 T3

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

ES 2 823 563 T3

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 60
<211> 217
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> cadena ligera del anticuerpo de referencia

<400> 60
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Thr Asp Gly
85 90 95

ES 2 823 563 T3

Leu Ser Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 61
 <211> 451
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> cadena pesada del anticuerpo de referencia

<400> 61
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 823 563 T3

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 62
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> cadena ligera del anticuerpo de referencia

<400> 62
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr

ES 2 823 563 T3

85

90

95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 63
<211> 619
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> polipéptido de fusión

<400> 63
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ES 2 823 563 T3

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

ES 2 823 563 T3

<210> 64
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> polipéptido de fusión

<400> 64
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 10 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

ES 2 823 563 T3

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 450 455 460

Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser
 465 470 475 480

Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys
 485 490 495

Trp Tyr Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Leu Leu Arg Glu Asp Lys
 500 505 510

Asp Pro Arg Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys
 515 520 525

Ser Tyr Asp Val Thr Arg Val Glu Phe Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Tyr
 530 535 540

Gln Ile Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu
 545 550 555 560

Gly Gly Ile Glu Ser Met Pro Gly Met Thr Ser Phe Leu Val Arg Val
 565 570 575

Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Ile Val Phe Phe Lys Tyr Val
 580 585 590

Tyr Gln Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys
 595 600 605

Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser
 610 615 620

Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln
 625 630 635 640

Ala Ile Asp Gly

<210> 65
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada del anticuerpo de referencia

10

<400> 65

ES 2 823 563 T3

gaagtgcagc tggtcgaaag tgggtggtggt ctggtgcagc ccggtagaag tctgctctg 60
tcttgtgccg catctggttt tacattcgac gattacgcaa tgcattgggt gagacaggcc 120
cccggcaagg gactggagtg ggtctccgct atcacctgga acagcgggca tattgactac 180
gcagattccg tggaaaggcag gttcacaatc tctcgggaca acgccaagaa tagtctgtat 240
ctgcagatga attcactgag ggccgaggat accgccgtgt actattgcgc taaagtctct 300
tatctgtcta ccgcatcatc tctggattac tggggtcagg gaacactggt cactgtctcc 360
tctgctagca caaagggccc tagtgtgttt cctctggctc cctcttccaa atccacttct 420
ggtggcactg ctgctctggg atgcctggtg aaggattact ttctgaacc tgtgactgtc 480
tcatggaact ctggtgctct gacttctggt gtccacactt tcctgctgt gctgcagtct 540
agtggactgt actctctgtc atctgtggtc actgtgccct cttcatctct ggaacccag 600
acctacattt gtaatgtgaa ccacaaacca tccaacacta aagtggacaa aaaagtggaa 660
cccaaactct gtgacaaaac ccacacctgc ccacctgtc ctgccctga actgctggga 720
ggaccttctg tgtttctggt cccacaaaa caaaagata ccctgatgat ctctagaacc 780
cctgagtgga catgtgtggt ggtggatgtg tctcatgagg accctgaggt caaattcaac 840
tggtagctgg atggagtgga agtccacaat gccaaaacca agcctagaga ggaacagtac 900
aattcaacct acagagtgggt cagtgtgctg actgtgctgc atcaggattg gctgaatggc 960
aaggaataca agtgtaaagt ctcaaacaag gccctgctg ctccaattga gaaaacaatc 1020
tcaaaggcca agggacagcc tagggaaccc caggtctaca ccctgccacc ttcaagagag 1080
gaaatgacca aaaaccaggt gtccctgaca tgcctggtca aaggcttcta cccttctgac 1140
attgctgtgg agtgggagtc aaatggacag cctgagaaca actacaaaac aacccccct 1200
gtgctggatt ctgatggctc tttcttctg tactccaaac tgactgtgga caagtctaga 1260
tggcagcagg ggaatgtctt ttcttgctct gtcatgcatg aggctctgca taaccactac 1320
actcagaaat ccctgtctct gtctcctggc aaa 1353

<210> 66
<211> 642
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> cadena ligera del anticuerpo de referencia

<400> 66
gacatccaga tgacccagag cccaagttcc ctgagcgcaa gcgtcggaga tcgtgtgact 60

ES 2 823 563 T3

attacctgta gagcaagcca gggcatcaga aactacctgg catggtatca gcagaagccc 120
 ggtaaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcttccactc tgcagtctgg cgtgccaaagc 180
 aggttctctg gcagtggatc agggaccgac tttaccctga caatttccag cctgcagccc 240
 gaggatgtcg ctacatacta ttgccagcgg tacaatcggg caccttatac attcggtcag 300
 gggactaaag tggaaatcaa gagaactgtc gcggcgcctt ctgtgttcat tttcccccca 360
 tctgatgaac agctgaaatc tggcactgct tctgtggtct gtctgctgaa caacttctac 420
 cctagagagg ccaaagtcca gtggaaagtg gacaatgtc tgcagagtgg gaattcccag 480
 gaatctgtca ctgagcagga ctctaaggat agcacatact ccctgtcctc tactctgaca 540
 ctgagcaagg ctgattacga gaaacacaaa gtgtacgcct gtgaagtac acatcagggg 600
 ctgtctagtc ctgtgaccaa atccttcaat aggggagagt gc 642

<210> 67
 <211> 1857
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> polipéptido de fusión

10

<400> 67
 gaagtgcagc tggtcgaaag tgggtggtggt ctggtgcagc ccggtagaag tctgcgtctg 60
 tcttgtgccg catctggttt tacattcgac gattacgcaa tgcattgggt gagacagggc 120
 cccggcaagg gactggagtg ggtctccgct atcacctgga acagcgggca tattgactac 180
 gcagattccg tggaaaggcag gttcacaatc tctcgggaca acgccaagaa tagtctgtat 240
 ctgcagatga attcactgag ggccgaggat accgccgtgt actattgcgc taaagtctct 300
 tatctgtcta ccgcatcatc tctggattac tggggtcagg gaacactggt cactgtctcc 360
 tctgctagca caaagggccc tagtgtgttt cctctggctc cctcttcaa atccacttct 420
 ggtggcactg ctgctctggg atgcctggtg aaggattact ttctgaacc tgtgactgtc 480
 tcatggaact ctggtgctct gacttctggt gtccacactt tccctgctgt gctgcagtct 540
 agtggactgt actctctgtc atctgtggtc actgtgcctt ctcatctct gggaaccag 600
 acctacattt gtaatgtgaa ccacaaacca tccaacacta aagtggacaa aaaagtggaa 660
 cccaaatcct gtgacaaaac ccacacctgc ccacctgtc ctgccctga actgctggga 720
 ggaccttctg tgtttctggt cccacaaaa ccaaaagata ccctgatgat ctctagaacc 780
 cctgaggtga catgtgtggt ggtggatgtg tctcatgagg accctgaggt caaattcaac 840
 tggtagctgg atggagtgga agtccacaat gccaaaacca agcctagaga ggaacagtac 900
 aattcaacct acagagtggc cagtgtgctg actgtgctgc atcaggattg gctgaatggc 960

ES 2 823 563 T3

aaggaataca agtgtaaagt ctcaaacaag gccctgcctg ctccaattga gaaaacaatc 1020
 tcaaaggcca agggacagcc tagggaaccc caggtctaca ccctgccacc ttcaagagag 1080
 gaaatgacca aaaaccaggt gtccctgaca tgcctggtca aaggcttcta cccttctgac 1140
 attgctgtgg agtgggagtc aaatggacag cctgagaaca actacaaaac aacccccct 1200
 gtgctggatt ctgatggctc tttctttctg tactccaaac tgactgtgga caagtctaga 1260
 tggcagcagg ggaatgtcct ttcttgctct gtcatgcatg aggctctgca taaccactac 1320
 actcagaaat ccctgtctct gtctcctggc aaaggcggcg gaggatccgg cggaggaggt 1380
 agcggcggag gaggtagcgc atcagacgag gaaatccagg acgtgtcagg gacctggtac 1440
 ctgaaagcca tgaccgtgga tttttggtgc tccggcatcc atgaggagtc agtcactccc 1500
 atgaccctga caaccctaga aggtgggaat ctggaggcca aagtgacaat ggatattgag 1560
 ggctttctcc aggagttcaa agccgtctc gagaagacag acgagcctgg aaagtatact 1620
 gctgatgggg gaaaacacgt agcctatata attcgatctc ggggaagga tcattatata 1680
 ttctattccg agggcgactg ccccgccct gtgccaggtg tctggctagt tgggagggac 1740
 cccaagaaca atctcgaggc tctggaggac ttcgagaagg cagctggtgc caggggattg 1800
 agcactgagt ctatccttat cccacgccag agcgagacct caagcccagg gtccgac 1857

<210> 68
 <211> 1932
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> polipéptido de fusión

10

<400> 68
 gaagtgcagc tggcgaag tgggtggtgt ctggtgcagc ccggtagaag tctgcgtctg 60
 tcttgtgccg catctggttt tacattcgac gattacgcaa tgcattgggt gagacaggcc 120
 cccggcaagg gactggagtg ggtctccgct atcacctgga acagcgggca tattgactac 180
 gcagattccg tgaagggcag gttcacaatc tctcgggaca acgccaagaa tagtctgtat 240
 ctgcagatga attcactgag ggccgaggat accgccgtgt actattgctc taaagtctct 300
 tatctgtcta ccgcatcatc tctggattac tggggtcagg gaacactggt cactgtctcc 360
 tctgctagca caaagggccc tagtgtgttt cctctggctc cctcttccaa atccacttct 420
 ggtggcactg ctgctctggg atgcctggtg aaggattact ttctgaacc tgtgactgtc 480
 tcatggaact ctggtgctct gacttctggt gtccacactt tccctgctgt gctgcagtct 540
 agtggactgt actctctgtc atctgtggtc actgtgcctt ctcatctct gggaaaccag 600
 acctacattt gtaatgtgaa ccacaaacca tccaacacta aagtggacaa aaaagtggaa 660
 cccaaatcct gtgacaaaac ccacacctgc ccacctgtc ctgccctga actgctggga 720

ES 2 823 563 T3

ggaccttctg tgtttctggt cccaccaaaa ccaaaagata ccctgatgat ctctagaacc	780
cctgaggtga catgtgtggt ggtggatgtg tctcatgagg accctgaggt caaattcaac	840
tggtagctgg atggagtgga agtccacaat gccaaaacca agcctagaga ggaacagtac	900
aattcaacct acagagtggg cagtgtgctg actgtgctgc atcaggattg gctgaatggc	960
aaggaataca agtgtaaagt ctcaaacaag gccctgcctg ctccaattga gaaaacaatc	1020
tcaaaggcca agggacagcc tagggaaccc caggtctaca ccctgccacc ttcaagagag	1080
gaaatgacca aaaaccaggt gtccctgaca tgcctgggtca aaggcttcta cccttctgac	1140
attgctgtgg agtgggagtc aaatggacag cctgagaaca actacaaaac aacccccct	1200
gtgctggatt ctgatggctc tttctttctg tactccaaac tgactgtgga caagtctaga	1260
tggcagcagg ggaatgtctt ttcttgctct gtcatgcatg aggctctgca taaccactac	1320
actcagaaat ccctgtctct gtctcctggc aaagggggcg gaggatccgg ggggtgggga	1380
agcggcggag gaggtagcca ggattcaacc agcgatctga ttccagcacc gccactgtcg	1440
aaagtccac tgcaacaaaa ctttcaagat aaccagttc acggcaagtg gtatgtggtc	1500
ggggagggcg gtaacctgct gctgagggaa gacaaagatc cacggaaaat gaccgccacc	1560
atctacgagc tgaagagga taagtcctac gacgtgactc gggtaggagt cggcgcaaaa	1620
acctacaagt accagatcgg caccttctgt cccggctctc agcctggcga gtttaccctg	1680
ggcggcatcg aatctatgcc cggcatgacc agctttctcg tgcgggtggt gtccaccaac	1740
tacaaccagc acgccatcgt gttcttcaaa tacgtgtacc agaaccgcga gtacttcgag	1800
atcacctgt acggccggac caaagagctg acctccgaac tgaaagagaa cttcatccgg	1860
ttctccaagt ccctgggcct gcccgagaac cacatcgtgt tccccgtgcc tatcgaccag	1920
gccatcgacg gc	1932

REIVINDICACIONES

1. Muteína de lipocalina lagrimal humana que tiene especificidad de unión para IL-17A, en la que la muteína se une a IL-17A con una K_D de aproximadamente 1 nM o menos, en la que la muteína tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, y en la que la muteína comprende las siguientes mutaciones de residuos de aminoácidos en posiciones de secuencia correspondientes a la secuencia polipeptídica lineal de lipocalina lagrimal humana madura (SEQ ID NO: 41): Arg 26 → Phe; Glu 27 → Trp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Ser; Glu 30 → Gly; Met 31 → Ile; Asn 32 → His; Leu 33 → Glu; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Glu; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Leu; Val 64 → Phe; His 92 → Arg; Cys101 → Ser; Glu 104 → Asp; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; delección de Lys 108; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; y Cys 153 → Ser.
2. Muteína según la reivindicación 1, en la que dicha muteína reacciona de manera cruzada con IL-17A humana, IL-17A de cynomolgus e IL-17A de mono tití.
3. Muteína según la reivindicación 1, en la que la muteína es capaz de unirse a IL-17A con un valor de K_D inferior al de SEQ ID NO: 42.
4. Muteína según la reivindicación 1, en la que la muteína es capaz de inhibir la unión de IL-17A a su receptor IL-17RA y/o bloquear la secreción de G-CSF inducida por IL-17A con un valor de CE_{50} inferior al de SEQ ID NO: 42.
5. Muteína según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la muteína tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
6. Proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades, en la que una subunidad es la muteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y otra subunidad
 - (a) tiene afinidad específica por IL-23p19;
 - (b) contiene un dominio de unión a albúmina (ABD) o un péptido de unión a albúmina;
 - (c) es una parte Fc de un anticuerpo humano; o
 - (d) contiene una proteína inhibidora de TNF.
7. Proteína de fusión según la reivindicación 6, en la que una subunidad de la proteína de fusión comprende una muteína de lipocalina que se une a IL-23p19 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menos.
8. Proteína de fusión según la reivindicación 6, en la que la proteína de fusión incluye un ligador que une covalentemente una subunidad que comprende una muteína de lipocalina con otra subunidad, o en la que una subunidad de la proteína de fusión está unida directamente o por medio de un ligador químico a otra subunidad de la proteína de fusión.
9. Muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en la que
 - (a) la muteína o proteína de fusión está conjugada con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una molécula orgánica, un marcador enzimático, un marcador radiactivo, un marcador coloreado, un marcador fluorescente, un marcador cromogénico, un marcador luminiscente, un hapteno, digoxigenina, biotina, un agente citostático, una toxina, un complejo de metal, un metal y oro coloidal;
 - (b) la muteína o proteína de fusión está fusionada en su extremo N-terminal y/o su extremo C-terminal a un resto que es una proteína, un dominio proteico o un péptido; o
 - (c) la muteína o proteína de fusión está conjugada con un resto que extiende la semivida sérica de la muteína o proteína de fusión.
10. Muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno en el que la unión de IL-17A es útil para tal diagnóstico.
11. Método de detección de la presencia de IL-17A en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con una muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en condiciones que permiten la formación de un complejo de la muteína e IL-17A.
12. Muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8 para su uso en la unión de IL-17A en un sujeto.

- 5
13. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
14. Célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13.
- 10
15. Método de producción de una muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la muteína o la proteína de fusión se produce partiendo del ácido nucleico que codifica para la muteína o la proteína de fusión.

Figura 1

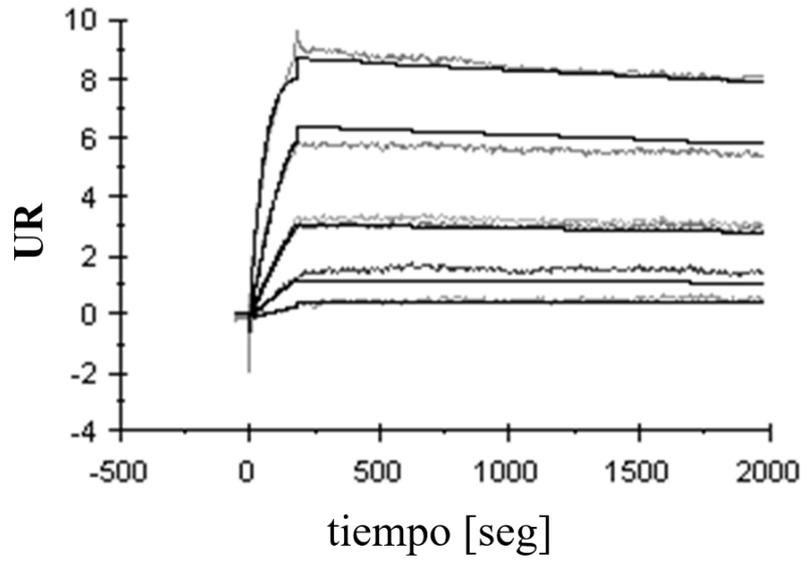


Figura 2

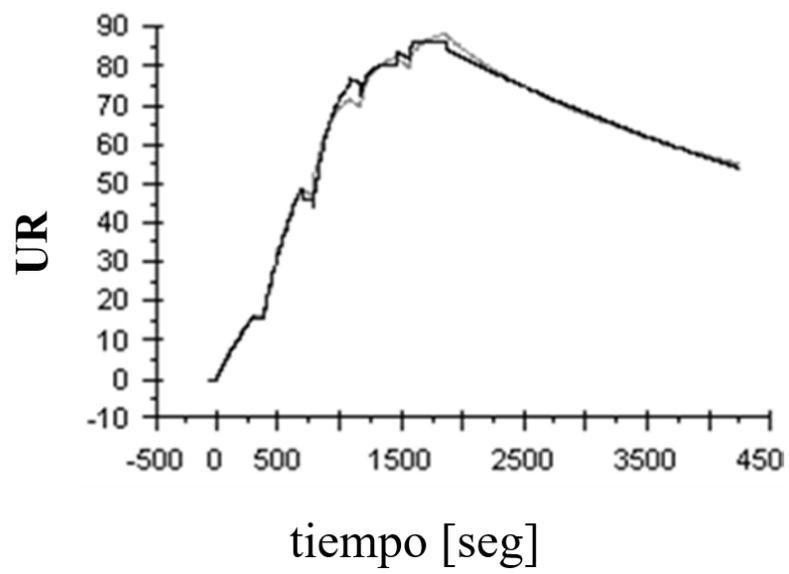


Figura 3

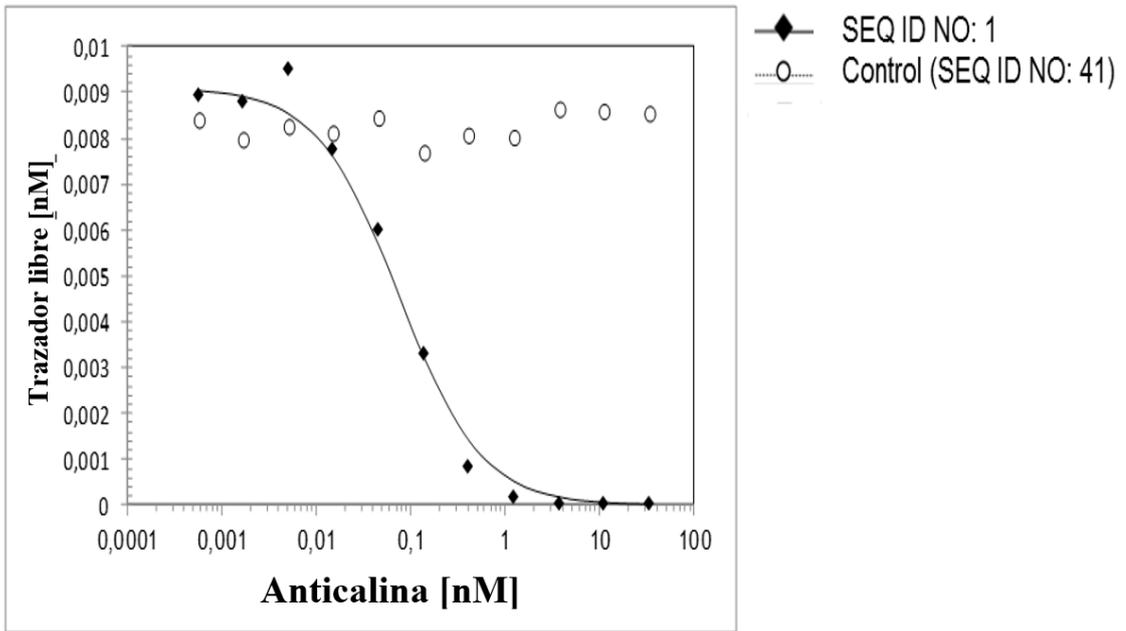


Figura 4

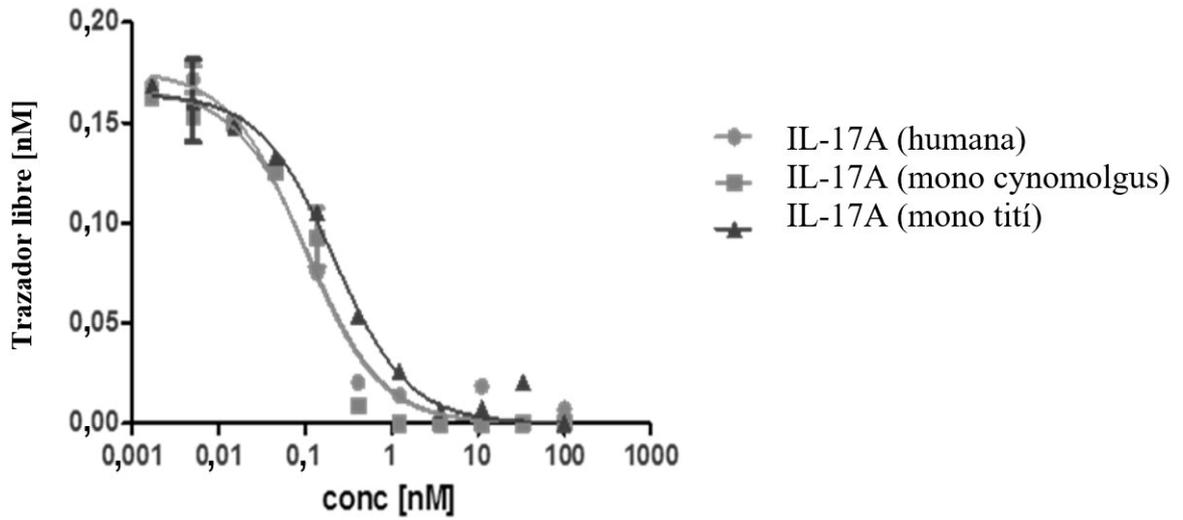


Figura 5

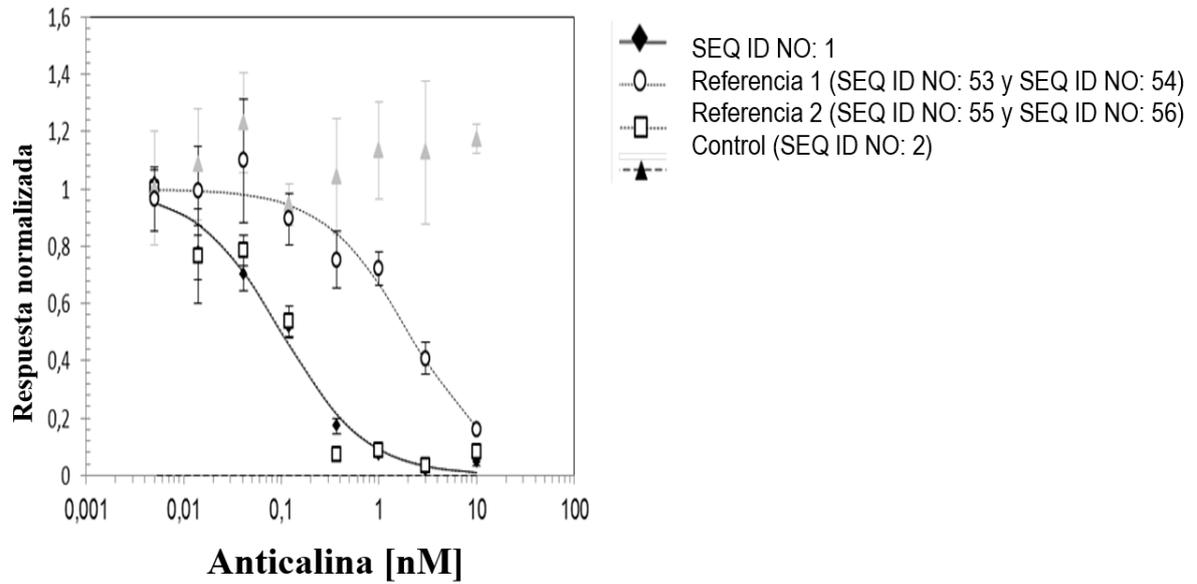


Figura 6

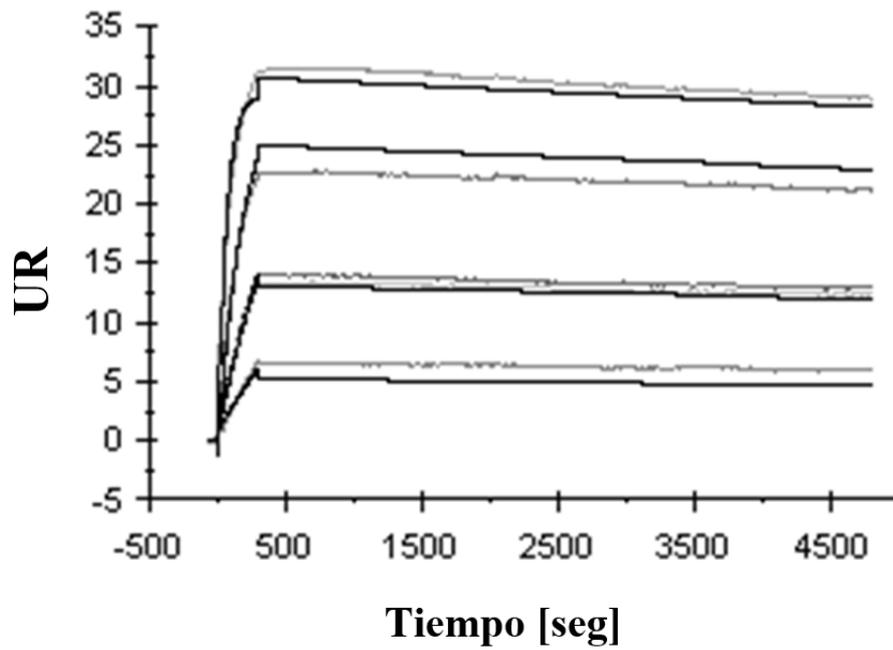


Figura 7

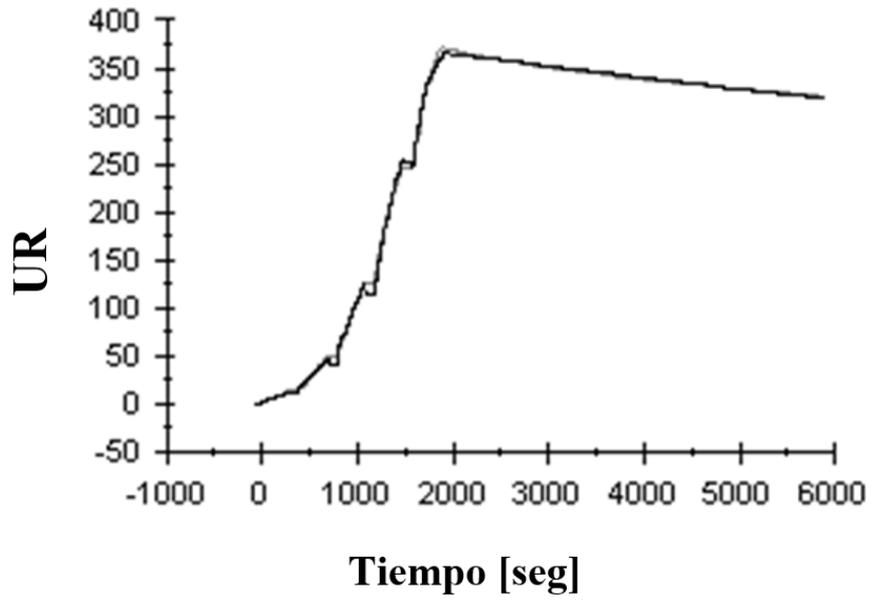


Figura 8

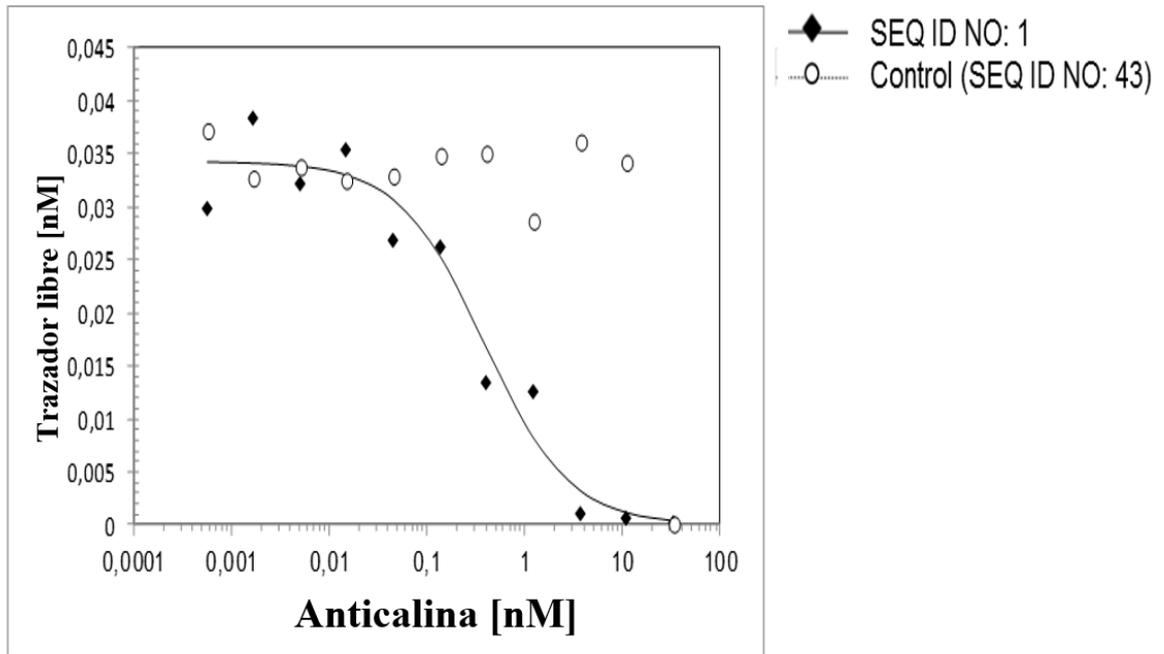


Figura 9

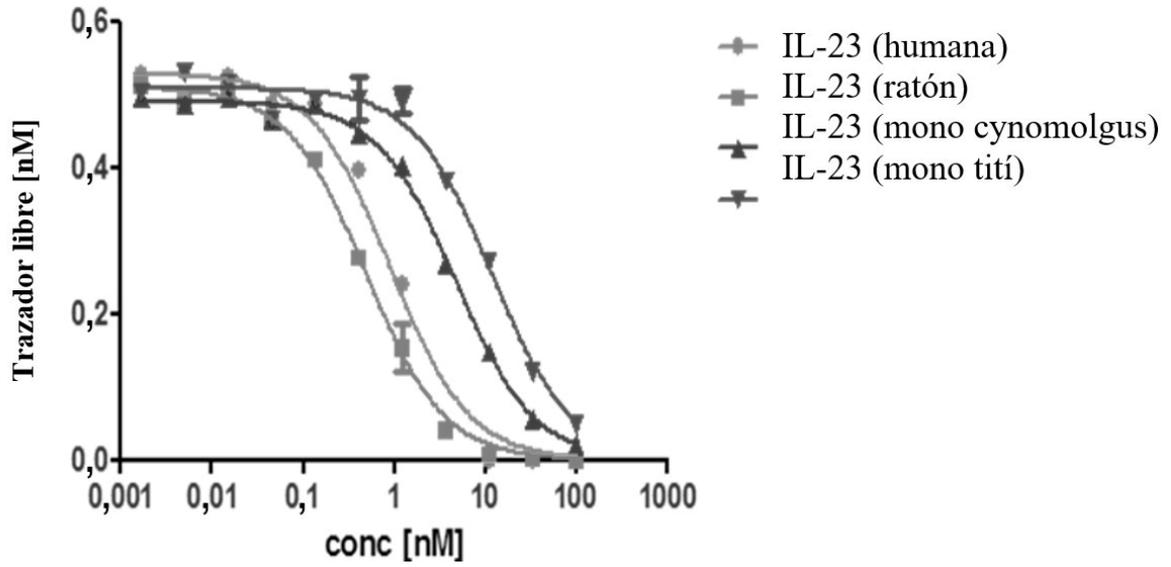


Figura 10

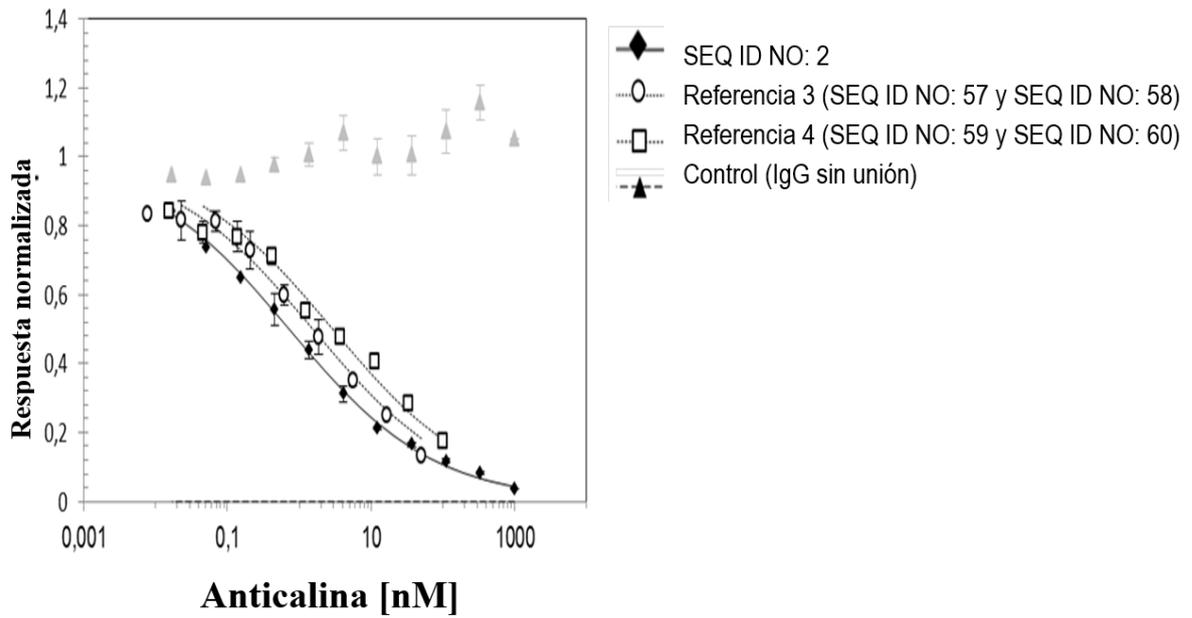


Figura 11

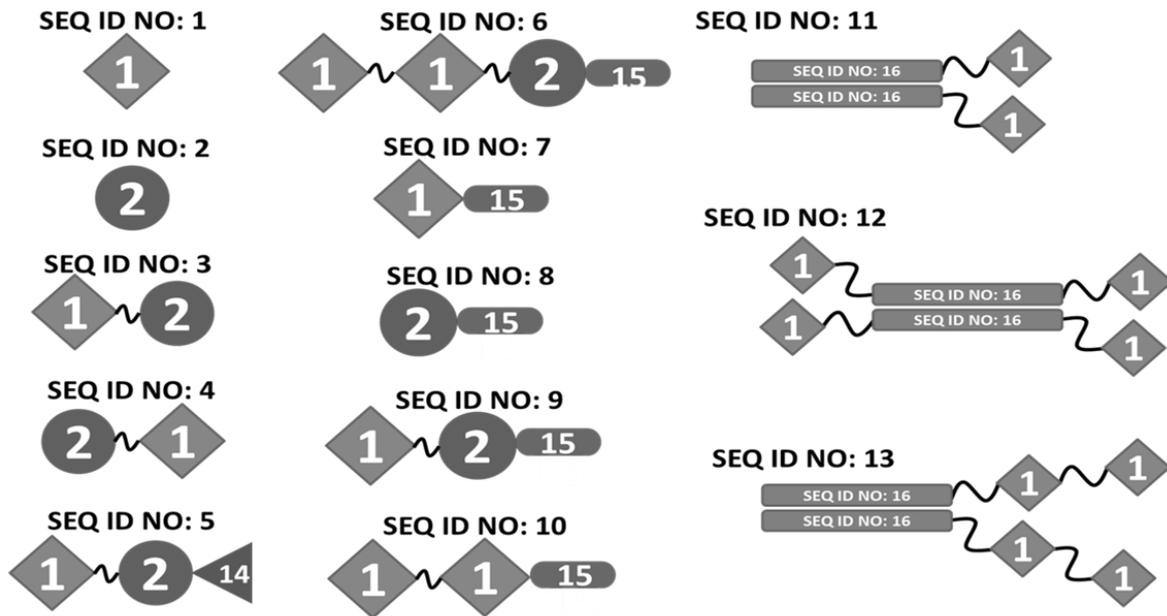


Figura 12

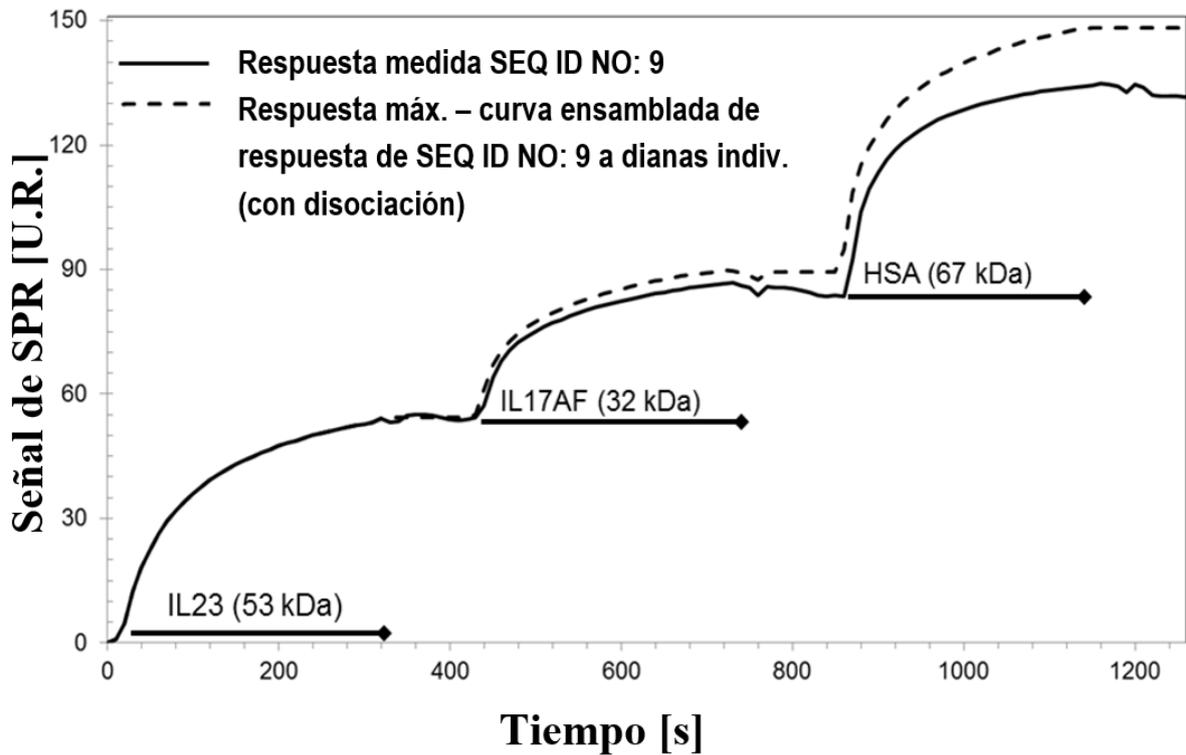


Figura 13

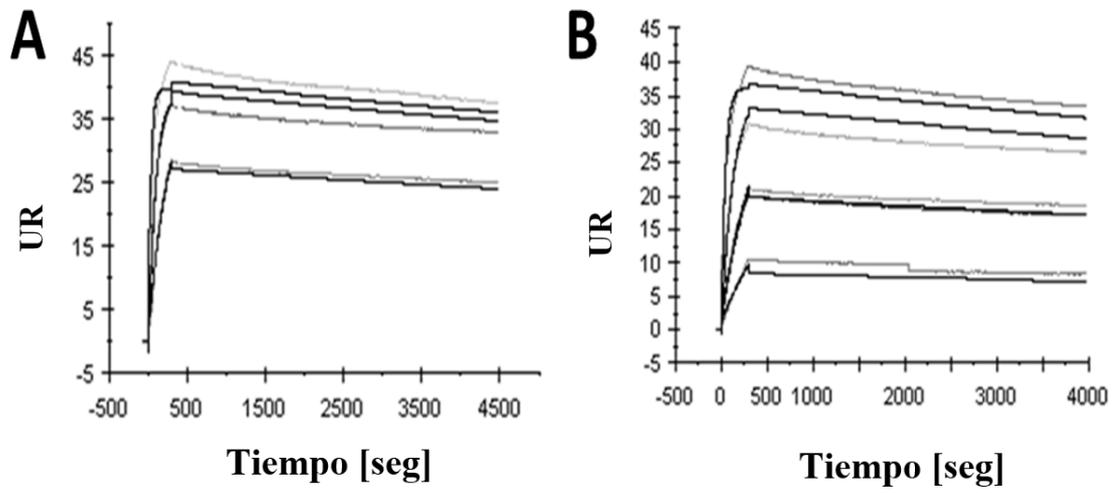


Figura 14

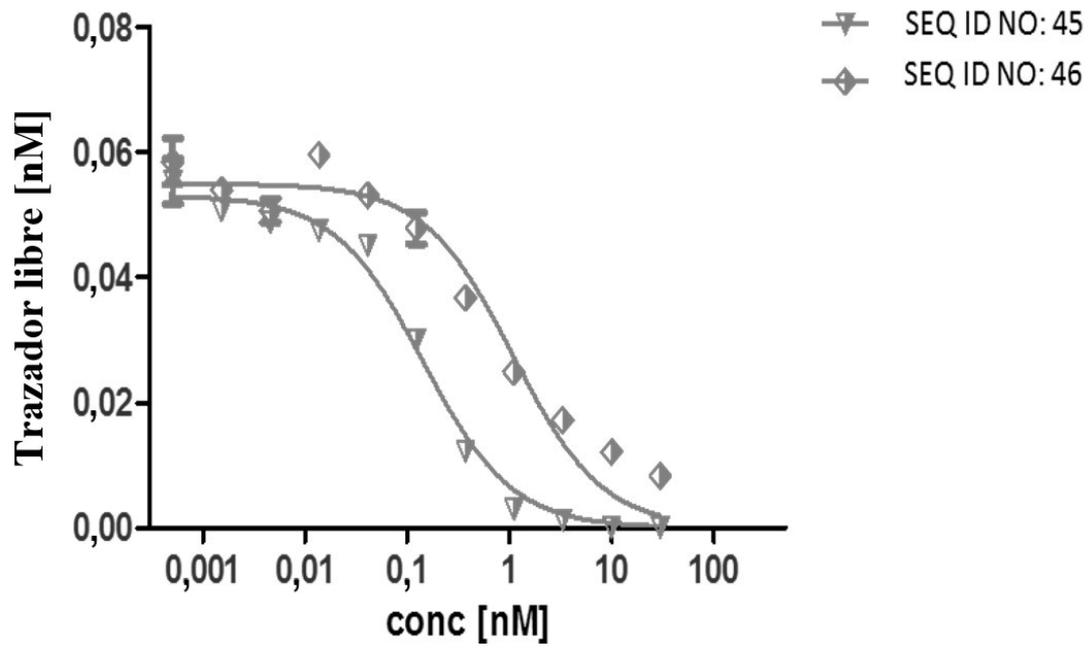


Figura 15

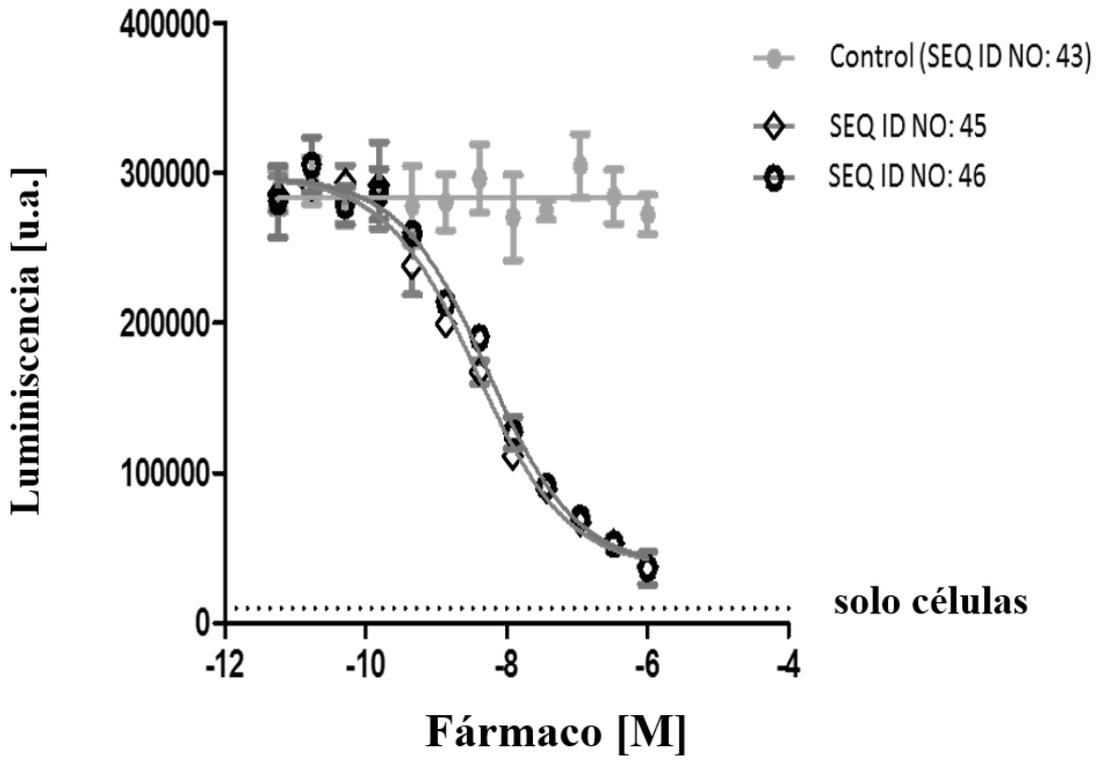


Figura 16

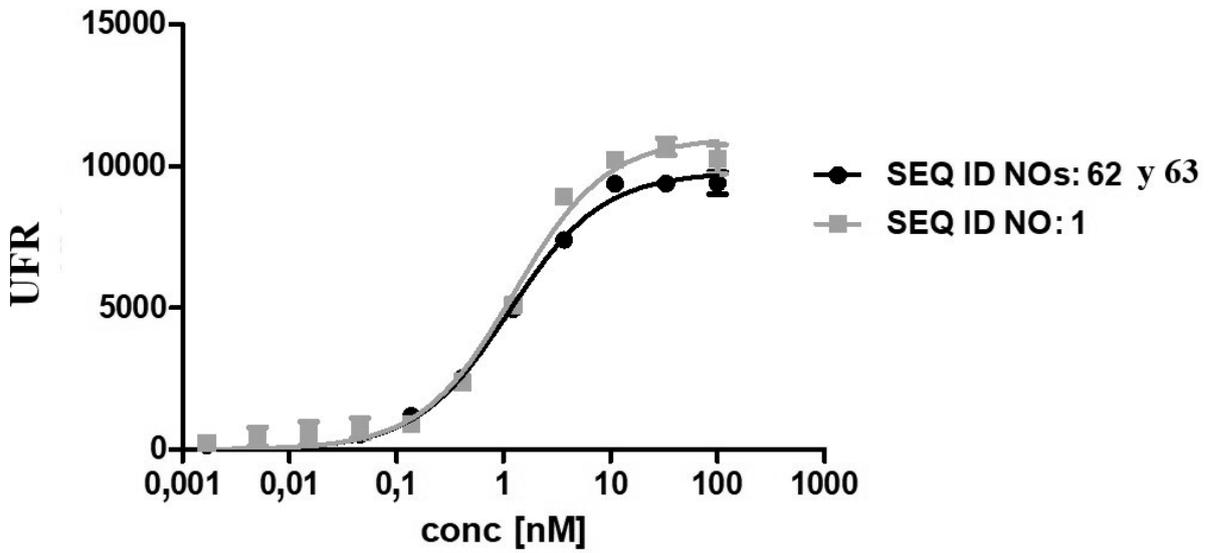


Figura 17

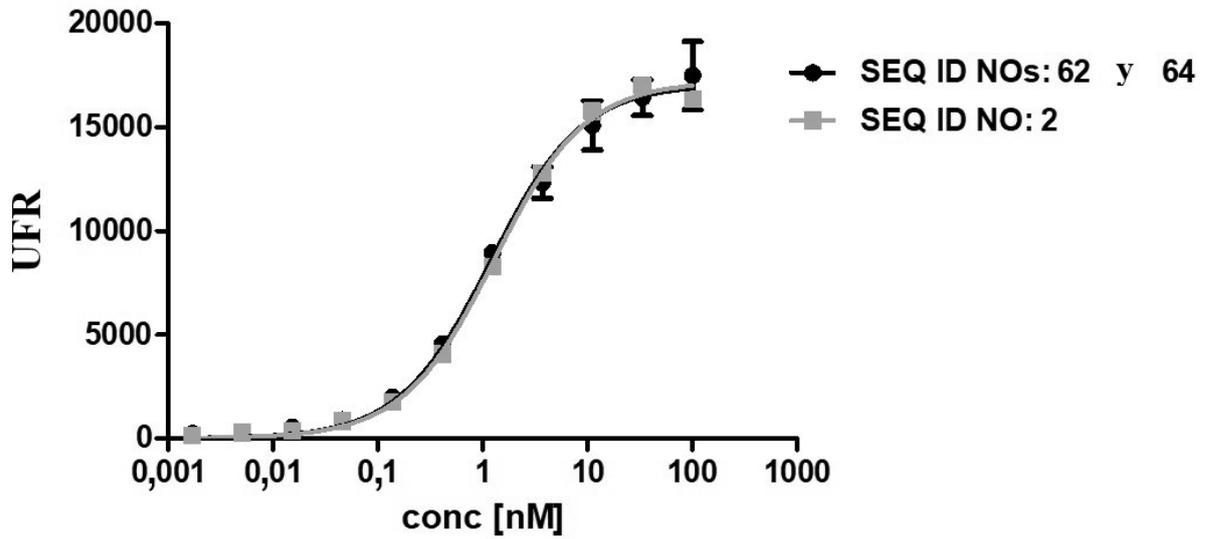


Figura 18

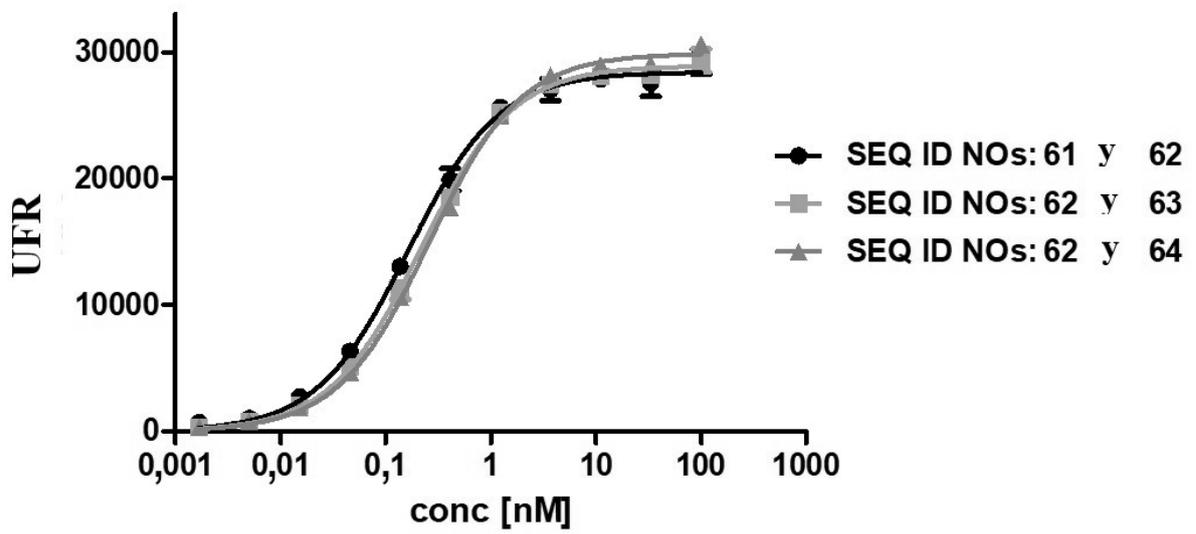


Figura 19

