BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-119382

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: NOVEDOSAS MOLÉCULAS DE ANTICUERPOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE SE ENLAZAN CON LA PROTEINA DE TENSIÓN FUNGICA HSP90

SOLICITANTE: NOVARTIS AG

DIRECCIÓN: Lichtstrasse 35, CH- 4056 Basel, Suiza

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 23 de Octubre de 2009

P2009/000173

Con- Anexo, no pago Certific.

F.N. 27-11-2009

OLARTERAISBECK

OLARTE RAISBECK MOU

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-119382- -00000-0000

Fecha: 2009-10-23 17:03:59 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 445

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2009/000173**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[ ] Capítulo I. [X] Capítulo II.

SOLICITANTE (71)

Nombre: NOVARTIS AG
Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel
Nacionalidad o Domicilio: Suiza
Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: **1)** James BURNIE **2)** Phillip WECHNER
Dirección: **1)** 1 Gresytoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SK9 7PY Gran Bretaña **2)** Hussistrasse 27c, A-6130 Schwaz Austria
Nacionalidad o Domicilio: Británica y Austriaca

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/055006 Fecha Abril 24, 2008

Publicación Internacional No. WO 2008/132134 Fecha Noviembre 6, 2008

(6) **Título (54)** **NOVEDOSAS MOLÉCULAS DE ANTICUERPOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE SE ENLAZAN CON LA PROTEINA DE TENSIÓN FUNGICA HSP90**

Clasificación Internacional (51) C07K 16/14, A61K 39/395, A61P 31/00, A61K 35/00, C12N 15/10, C07K 16/18, A61P 37/06

Prioridad
SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
EP	Abril 27, 2007	07107140.1
EP	Julio 27, 2007	07113353.2

(9) **Comprobante de pago No.** 09-77880 **Fecha** Octubre 15 de 2009

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 08-066177
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional.

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 77,880
FECHA : OCTUBRE 15 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-119382- -00000-0000
Fecha: 2009-10-23 17:03:59 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 445

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130888623	15/10/2009	5,283,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL : $	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Novartis AG a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

1. En esta fecha, día 30 de Agosto de 2006, yo, el suscrito Notario Público certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del señor Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca, Suiza, residente en Wisen/SO, Suiza, y del Sr. Pascal Traub, ciudadano de Riehen, Suiza, residente en Basilea, Suiza, ambos personas mayores de edad y con dirección comercial en Lichstrasse 35, 4056, Basilea, Suiza. La autenticidad de la firmas fue establecida por medio de la comparación.
2. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas han ejecutado el anterior documento como apoderados de Novartis AG.
3. Además, yo, el Notario Público certifico por el presente que Novartis AG, con su principal lugar de negocios en Basilea, Suiza, está debidamente constituida, está actualmente vigente y que los propósitos para los cuales se otorgó el Documento de Poder están dentro del alcance de sus propósitos corporativos.

Traductor Ofi
JORGE E. SIERRA
Licencia 376 - 1993

4. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas tienen la autoridad para ejecutar el documento de Poder y que por este instrumento, su representación es legal.

La base para mis certificaciones de los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

- Documento de Poder de Novartis AG fechado el 19 de junio de 2006 y
- Extracto del Registro de Comercio del Cantón de la ciudad de Basilea para Novartis AG, en Basilea, fechado el 25 de enero de 2006.

Basilea, Suiza, este día 30 de Agosto de 2006.

(Firmado) Dr. Matthias Staehelin, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea, Suiza.

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

Hay una Apostilla de Suiza, firmada por Heidi Fischer, bajo el No. 8049/13584.

Traductor Ofi
JORGE E. SIERRA
Licencia 376 - 1993

6

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Novartis"

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8346

Traductor Ofi
JORGE E. SIERRA
Licencia 376 - 1993

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. O.
J. Ian Raisl
Ana María F
Juan Guillermo M
Natalia Ca

Zayde Ch
Jacqueline Chap
José Luis Lond
Felipe Menc
Simón Sal

Of Cou
Guillermo Chr
Graciela M

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

NOVARTIS AG

domiciled in

domiciliado en

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las **Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Arthur Cannon

Pascal Haub

Date/Fecha: June 27, 2006

City,Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland

8

Attestation

1 On this date, the 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six), I, the undersigned Notary Public certify herewith the authenticity of the signatures of **Mr. Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland and of **Mr. Pascal Traub**, citizen of Riehen, Switzerland, residing in Basel, Switzerland, both of legal age and with business address at, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland. The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

2 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have executed the foregoing document as proxy holders for Novartis AG.

3 Further, I, the Notary Public certify herewith that Novartis AG, having its principal place of business located in Basel / Switzerland, is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have the authority to execute the Power of Attorney and that for this instrument their representation is legal.

The foundation for my certifications contained in points 2 (two), 3 (three) and 4 (four) was the exhibition of the following authentic documents:

- Power of Attorney by Novartis AG dated June 19 (nineteen), 2006 (two thousand and six); and
- Extract from the Register of Commerce of the Canton of Basel-City for Novartis AG, in Basel, dated January 25 (twenty-five), 2006 (two thousand and six).

BASEL, Switzerland, this 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six)

M. Staehelin Notar

Dr. Matthias Staehelin, Notary Public
in the Canton of Basel-City, Switzerland

My license expires on March 11 (eleven), 2009 (two thousand and nine).

Leg.Prot.Nr. 975 /2006

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
   This official document
2. is signed by .....
   .....
3. in his/her function as .....
4. and certified by the seal of the .....
   .....

Certified 30. Aug. 2006

5. in Basel (Bâle) 6. on .....
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt .....
8. no. 6'0891 / 18'389
9. Seal / stamp: 10. Signature:

Heidi Fischer

STATE CHANCERY * BASLE-CITY *

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 November 2008 (06.11.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/132134 A9

(51) International Patent Classification:
C07K 16/14 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/055006

(22) International Filing Date: 24 April 2008 (24.04.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07107140.1 27 April 2007 (27.04.2007) EP
07113353.2 27 July 2007 (27.07.2007) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **BURNIE, James** [GB/GB]; 1 Gresytoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SK9 7PY (GB). **WECHNER, Philipp** [AT/AT]; Hussistrasse 27c, A-6130 Schwaz (AT).

(74) Agent: **GRUBER, Markus**; Novartis Pharma AG, Patent Department, CH-4002 Basel (CH).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL ANTIBODY MOLECULES AND NUCLEIC ACIDS BINDING TO FUNGAL STRESS PROTEIN HSP90

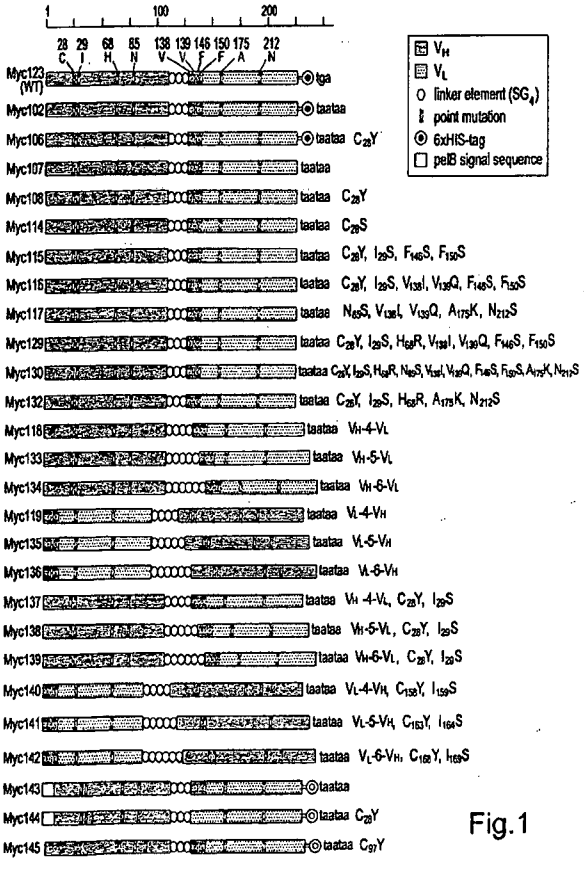


Fig.1

(57) Abstract: An scFv peptide comprising a V_H domain and a V_L domain linked by an amino acid spacer is disclosed. The V_H domain comprises a sequence with at least 80% sequence identity to the sequence of SEQ ID NO. 64. The V_L domain comprises a sequence with at least 80% sequence identity to the sequence of SEQ ID NO. 66. The scFv peptide also comprises the substitution or deletion of an amino acid in the V_H domain at the position corresponding to C_{28}.

WO 2008/132134 A9

ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

(48) Date of publication of this corrected version:
9 July 2009

(15) Information about Correction:
see Notice of 9 July 2009

NOVEL ANTIBODY MOLECULES AND NUCLEIC ACIDS BINDING TO FUNGAL STRESS PROTEIN HSP90

The present invention relates to novel antibody molecules specifically binding to fungal stress protein hsp90, nucleic acids encoding such peptides and pharmaceutical compositions and uses thereof.

An antibody fragment binding to the hsp90 fungal stress protein as well as therapeutic uses of it has been described e.g. in WO01/76627 or WO05/102386. The antibody fragment, also known as Mycograb® (Efungumab), is a fusion protein comprising the V_H and V_L domains of immunoglobulin connected by a linker peptide. Such antibody fragments are also known as "single chain variable fragment" (scFv). Mycograb® is produced by fermentation in *E.coli* in the form of inclusion bodies, which are extracted from the cell mass, refolded and subsequently purified by chromatographic steps under denaturing conditions. Characterization studies performed under native conditions have indicated that the efungumab protein has a tendency to form multimers or aggregates (the terms "multimers" and "aggregates" are used interchangeably herein). Such aggregates, in particular high molecular weight aggregates, may not be desirable for therapeutic uses. Thus, for therapeutic uses it may be desirable to eliminate or reduce the high molecular weight aggregates or to control aggregation such that the number of momomers, which a majority of such aggregates contain, are in a certain range, e.g. between 10 and 100 monomers, such as e.g. between 11 and 73 or 26 and 57 monomers.

The present invention now provides improved scFv peptides binding to hsp90 fungal stress protein, which have advantageous properties with respect to e.g. folding properties and/or formation of aggregates. The peptides of the invention are thus particularly useful for therapeutic uses.

According to one aspect of the present invention, there is provided a scFv peptide comprising a V_H domain and a V_L domain linked by an amino acid spacer, wherein the V_H domain comprises a sequence with at least 80% sequence identity to the sequence of

SEQ ID NO. 64 and the V_L domain comprises a sequence with at least 80% sequence identity to the sequence of SEQ ID NO. 66 and wherein the scFv peptide comprises an additional feature selected from the group consisting of:

(a) a substitution or deletion of an amino acid in the V_H domain at a position corresponding to that selected from the group consisting of: C_{28}, I_{29}, H_{68}, N_{85}, C_{97} and combinations thereof;

(b) a substitution or deletion of an amino acid in the V_L domain at a position corresponding to that selected from the group consisting of: V_2, V_3, F_{10}, F_{14}, A_{39}, N_{76} and combinations thereof;

(c) the amino acid spacer comprises the sequence $(GGGGS)_n$ wherein n is between 4 and 6;

(d) the V_H domain further comprises an N-terminal pelB signal sequence comprising the sequence of SEQ ID NO. 68 or a sequence having at least 80% sequence identity thereto;

(e) the V_L domain is located at the N-terminal end of the V_H domain; and

(f) combinations of features (a) to (e).

It is preferred that the V_H domain comprises a sequence with at least 90%, 95%, 99% or 100% identity to the sequence of SEQ. ID NO. 64. It is also preferred that the V_L domain comprises a sequence with at least 90%, 95%, 99% or 100% identity of the sequence of SEQ. ID NO. 66. It is to be undertood that the additional feature is present irrespective of the level of sequence identity. For example, if the additional feature is a substitution of the amino acid at position C_{28} then this substitution is present even in embodiments where the V_H domain comprises a sequence with only 80% sequence identity to SEQ. ID NO. 64.

Conveniently, the substitution of the amino acid in the V_H domain is selected from the group consisting of: $C_{28}Y$, $C_{28}S$, $I_{29}S$, $H_{68}R$, $N_{85}S$, $C_{97}Y$, $C_{97}S$ and combinations thereof. The substitution $C_{28}Y$ is particularly preferred.

Advantageously, the substitution of the amino acid in the V_L domain is selected from the group consisting of: V_2I, V_3Q, $F_{10}S$, $F_{14}S$, $A_{39}K$, $N_{76}S$ and combinations thereof.

Preferably, the scFv peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 wherein Xaa denotes an amino acid residue other than cysteine and wherein the N-terminal methionine residue may optionally be cleaved off. It is preferred that Xaa denotes a tyrosine residue.

In one embodiment Xaa is Tyr (Y). In another embodiment Xaa is Ala (A), Leu (L), Ile (I), Val (V), Pro (P) or Met (M); in yet another embodiment Xaa is Phe (F) or Try (W); in yet another embodiment Xaa is Gly (G); in yet another embodiment X is Ser (S) or Thr (T); in yet another embodiment Xaa is Glu (E) or Asp (D); in yet another embodiment Xaa is Gln (Q) or Asn (N); in yet another embodiment Xaa is Arg (R), Lys (K) or His (H).

Preferably the scFv peptide further comprises a purification tag, more preferably a sequence of 6 histidine residues at the C-terminus.

In accordance with another embodiment of the present invention, there is provided a scFv peptide consisting of, or consisting essentially of, an amino acid sequence as set forth SEQ ID NO. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 wherein said peptides may optionally comprise a purification tag such as e.g. a His-Tag (e.g. as set forth in SEQ ID NO. 10, 22 or 34).

The purification Tags typically do not contribute to the therapeutic effect of the molecule and may therefore be removed after purification of the scFv fragments of the present invention.

In accordance with another aspect of the present invention, there is provided a scFv peptide comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62. In one embodiment, there is provided a scFv peptide consisting of, or consisting essentially of, an amino acid sequence as set forth SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56,

58, 60 and 62 wherein said peptides may optionally also comprise a purification tag such as e.g. a His-Tag (e.g. as set forth in SEQ ID NO. 2, 4 or 20).

As readily appreciated by the skilled person, the first Met residue of the peptides of the present invention may be also cleaved off in vivo, e.g. by *E. coli* MAP (methionine amino peptidase) if expressed in *E. coli*.

The scFv peptides of the present invention comprise two domains linked by an amino acid spacer (the terms "spacer" and "linker" are used interchangeably), e.g. having the amino acid sequence $(GGGGS)_n$ wherein n is an integer from 1 to 12, e.g. 1, 2, 3, 4 or 5. One of the domains, designated as V_H, corresponds to the heavy chain part of the antibody fragment (corresponding e.g. to amino acid residues 2 to 122 in the scFv fragment of amino acid sequence set forth in SEQ ID NO. 2 and SEQ ID NO. 30, or amino acid residues 132 to 152 in SEQ ID NO. 32). The other domain, designated as V_L, corresponds to the light chain part of the antibody fragment (corresponding e.g. to amino acid residues 138 to 246 in SEQ ID NO. 2, or amino acid residues 138-246 in SEQ ID NO. 12, or amino acid residues 2 to 110 in SEQ ID NO. 32). The VH or the VL domain may be located at the N-terminus of the scFv peptides of the present invention, i.e. the molecules may be linked as follows: VH-linker-VL or VL-linker-VH.

The optional pelB signal sequence results in subcellular localisation of the peptide to the periplasmic membrane, when expressed in E. coli, in order to improve solubility of the peptide.

In one embodiment, there is provided a scFv fragment comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 30 or 32. In another embodiment, there is provided a scFv peptide consisting of, or consisting essentially of, an amino acid sequence as set forth SEQ ID NO. 30 or 32 wherein said peptides may optionally also comprise a purification tag such as e.g. a His-Tag.

In one aspect, the present invention provides scFv fragments comprising a VH and VL domain and a linker according to the present invention (e.g. as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 30, 32 or 34) having at least one amino acid

substituted at one or more of the following positions: C29X, I30X, H69X, N86X, C98X, V139X, V140X, F147X, F151X, A176X, N213X, wherein X denotes an amino acid other than as set forth in SEQ ID NO. 2 (the numbering is as set forth in SEQ ID NO. 2 and corresponding amino acid positions in other mutants can be easily determined). In a preferred embodiment, the present invention provides scFv fragments having at least one of the following amino acid substitution: C29Y or C29S, I30S, H69R, N86S, C98Y or C98S, V139I, V140Q, F147S, F151S, A176K, N213S. It is to be appreciated that numbering of amino acids in relation to this aspect includes the N-terminal methionine residue.

In one embodiment, there is provided a scFv fragment comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 24, 26 or 28. In another embodiment, there is provided a scFv peptide consisting of, or consisting essentially of, an amino acid sequence as set forth SEQ ID NO. 24, 26 or 28 wherein said peptides may optionally also comprise a purification tag such as e.g. a His-Tag.

The peptides of the present invention are useful as therapeutics. Accordingly, in one aspect of the present invention, there is provided a pharmaceutical composition comprising a scFv peptide according to the present invention, e.g. comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 wherein Xaa is defined as above, in combination with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier. Details of suitable excipients are provided in Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopoeia, 1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA. Exemplary excipients include pharmaceutical grade (Ph Eur) Urea and L-Arginine (Ph Eur). For example, a typical formulation of an scFv peptide of the invention is 10mg of pure scFv peptide, 150mg of pharmaceutical grade (Ph Eur) Urea and 174mg L-Arginine (Ph Eur) reconstituted in 5ml water.

An scFv peptide or a pharmaceutical composition of the invention may be administered in a dosage in the range of 0.1 to 10 mg/kg body weight of the patient. A dosage in the range 0.5 to 5 mg/kg body weight is preferred, with a dosage of around 1mg/kg being particularly preferred. The pharmaceutical composition may be administered orally.

The peptides of the present invention are useful in the treatment of fungal infections e.g. as disclosed in WO01/76627 or WO05/102386 each of which is hereby incorporated by reference. For example, the peptides of the present invention are useful in the treatment of systemic fungal infections such as invasive candidiasis or invasive aspergillosis or invasive meningitis e.g. virulent Candida species C. albicans, C. tropicalis and C. krusei and the less virulent species C. parapsilosis and Torulopsis glabrata. The peptides of the present invention are also useful in the treatment of infections by Candida, Cryptococcus, Histoplasma, Aspergillus, Torulopsis, Mucormycosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis, Paracoccidioidomycosis organism or malaria. Accordingly, the present invention provides a method of treating a patient with a fungal infection comprising administering to the patient an effective amount of a scFv peptide of the present invention, e.g. comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 wherein Xaa is defined as above. The N-terminal Met may optionally be cleaved off.

The peptides of the present invention are particularly useful for combination therapies. Accordingly, in another aspect, the present invention provides a composition or a combined preparation comprising a scFv peptide of the present invention, e.g. comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 (the N-terminal Met may optionally be cleaved off), wherein Xaa is defined as above, and a antifungal agent such as e.g. a polyene antifungal or a echinocandin antifungal or an azole antifungal. Examples of antifungals useful as combination partners of scFv peptides of the present invention include e.g. amphotericin B, derivatives of amphotericin B such as AmBisome, amphotericin-B lipid complex (Abelcet), amphotericin-B colloidal dispersion (Amphocil) and amphotericin-B intralipid emulsion; nystatin; 5-fluorocytosine; caspofungin, anidulafungin, micafungin, LY303366; azoles such as isavuconazole, voriconazole, itraconazole, fluconazole, miconazole, ketoconazole, posaconazole, anidulafungin, micafungin, griseofulvin, terbinafine. Though such combination may be a fixed dose combination, generally, the scFv peptide and its combination partner are not packaged as fixed dose combinations.

The combined preparations of the present invention may be for simultaneous, separate or sequential use in the treatment of fungal infections. The peptides of the present invention may also be used in combination with more than one antifungal agent, e.g. with amphotericin B and 5-fluorocytosine, a fungin and Amphotericin B or an echinocandin plus azole.

In another embodiment, the present invention provides a method of treating a patient with a fungal infection comprising administering to the patient an effective amount of a scFv peptide of the present invention, e.g. comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 (the N-terminal Met may optionally be cleaved off), wherein Xaa is defined as above, and at least one of the antifungal agents described above. Preferred combination partners are amphotericin B or derivatives of amphotericin B, caspofungin, anidulafungin, micafungin, voriconazole, itraconazole. The combination partners may be administered simultaneously, separately or sequentially.

In one embodiment of the present invention, the fungus causing the infection is resistant or partially resistant against an antifungal combination partner of the peptides of the invention.

The peptides of the present invention are also useful in the treatment of cancer, or a condition involving raised levels of TNFα and/or IL-6 such as autoimmune diseases or sepsis e.g. as disclosed in WO06/003384 or WO07/077454 (PCT/GB2007/000029) each of which is hereby incorporated by reference. For instance, the peptides of the present invention are useful in the treatment of leukemia such as e.g. lymphoid (lymphocytic) leukaemia (CLL), acute myeloid (myeloblastic) leukeemia (AML), acute lymphoid (lymphoblastic) leukeemia (ALL), chronic myeloid leukaemia (CML), carcinoma of the breast, carcinoma of the colon, prostate, multiple myeloma; or for the treatment of sepsis targeting human hsp90 (WO07/077454). Accordingly, the present invention provides a method of treating a patient with a cancer disease or a condition inviolving raised levels of TNFα and/or IL-6 (e.g. autoimmune disease, SIRS or sepsis) comprising administering to the patient an effective amount of a scFv peptide of the present

invention, e.g. comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 (the N-terminal Met may optionally be cleaved off), wherein Xaa is defined as above.

In some embodiments, the autoimmune disease is Crohn's disease, rheumatoid arthritis, ulcerative colitis or systemic lupus erythermatosus.

The peptides of the present invention are useful for combination therapies with anticancer agents. Examples of suitable anticancer agents include doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, herceptin, docetaxel, cisplatin, imatinib (Gleevec®), paclitaxel, cytarabine or hydroxyurea. Accordingly, the present invention provides a composition or a combined preparation comprising a scFv peptide of the present invention, e.g. comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 (the N-terminal Met may optionally be cleaved off), wherein Xaa is defined as above, and a anticancer agent selected from the group consisting of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, herceptin, docetaxel, cisplatin, imatinib, paclitaxel and hydroxyurea. Also provided are methods of treating a patient with a cancer disease comprising administering to the patient in need an effective amount of a scFv of the present invention, e.g. peptide comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 and 62 (the N-terminal Met may optionally be cleaved off), wherein Xaa is defined as above, and at least one of the anticancer agent selected from the group consisting of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, herceptin, docetaxel, cisplatin, imatinib, paclitaxel and hydroxyurea.

In accordance with another aspect of the present invention, there are provided improved nucleic acid molecules encoding scFv peptides as described and improved nucleic acid constructs which are particularly useful for expressing such scFv peptides e.g. in *E. coli*. The nucleic acid constructs of the present invention for instance lead to improved expression of the scFv peptides in *E. coli*, e.g. with respect to homogeneity and titer of the expressed scFv peptide.

Preferably, the nucleic acid molecule further comprises the sequence $(taa)_n$ located at the 3' end of the sequence encoding the scFv peptide wherein n is 1 or 2.

According to another aspect of the present invention, there is provided a nucleic acid molecule comprising a sequence encoding a V_H domain comprising a sequence having at least 80% sequence identity to the sequence of SEQ ID NO. 64 and a V_L domain comprising a sequence having at least 80% sequence identity to the sequence of SEQ ID NO. 66 and further comprising the sequence $(taa)_n$ located at the 3' end of the sequence encoding the V_H or V_L domains wherein n is 1 or 2. The provision of multiple stop codons at the 3' terminus avoids erroneous read-through events.

In another aspect the present invention provides a nucleic acid molecule, e.g. a DNA or RNA molecule, comprising a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61 wherein nnn denotes a codon coding for an amino acid other than Cys. For instance, in one embodiment, nnn may code for Tyr such as e.g. TAT. In another aspect, the present invention provides a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO.1, 3, 5, 11, 15 or 19. As appreciated by the skilled person, nucleic acid sequences can be readily modified without altering the encoded amino acid sequence. Nucleic acid molecules based on a nucleotide sequence comprising a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61. with one or more (e.g. up to 10, 20, 50 or 100) such silent mutations are also comprised within the scope of the present invention. Further encompassed are nucleic acid molecules which have (i) at least 80% identity, preferably at least 90%, 95%, 99% or 100% identity to SEQ. ID NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61; or (ii) hybridize under high stringency conditions to the nucleic acid molecules having a sequence as set forth in SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61. The term high stringency conditions is readily understood by the skilled person and may refer, e.g., to washing in 6X SSC/0.05% sodium pyrophosphate at 37°C. (for 14-base oligos), 48°C. (for 17-base oligos), 55°C.

(for 20-base oligos), and 60°C. (for 23-base oligos). Suitable ranges of such stringency conditions for nucleic acids of varying compositions are described in Krause and Aaronson (1991) Methods in Enzymology, 200:546-556.

In one embodiment, the present invention provides a vector molecule comprising a nucleotide sequence of a nucleic acid molecule of the invention, e.g. as set forth in SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61. Preferably, such vector molecule is suitable for expressing the nucleic acid molecules as set forth in SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61. in e.g. E. coli. Suitable expression vectors are readily known to the skilled person. An example of suitable vector includes for instance pGEX or pET. Another embodiment provides a host cell, e.g. E. coli, comprising such a vector molecule.

In another embodiment there is provided a method for producing a scFv peptide of the present invention, e.g. comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 or 62 (the N-terminal Met may optionally be cleaved off), wherein Xaa is defined as above which comprises culturing a host cell having incorporated therein an expression vector containing under control of suitable transcriptional control elements a nucleic acid sequence of a nucleic acid molecule of the invention e.g. as described in SEQ ID NO. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, or 61 under conditions sufficient for expression of said peptides in the host cell, e.g. *E. coli*, thereby causing the production of said peptide; and recovering the peptide produced by said cell.

The percentage "identity" between two sequences is determined using the BLASTP algorithm version 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-PLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) using default parameters. In particular, the BLAST algorithm can be accessed on the Internet using the URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/.

Brief Description of the Figures

Figure 1 is a diagram showing schematically the sequence of the wild type Mycograb scFv peptide and Mycograb mutants. Stop codons of the nucleic acid molecules encoding the respective peptides are also shown at the C-terminal end.

Figure 2 is a diagram showing the principle of the ELISA assay of Example 2.

Figure 3 is a graph in which the black bars show yield after solubilization with NLS of all investigated mutants. The error bars show the Standard deviation for samples analyzed twice. The white bars are a graphic representation of mass balance after NLS refolds of all investigated mutants. Mutants are ranked according to increasing refolding recovery values.

Figure 4 shows graphs indicating the recovery after refolding for 5 selected mutants when urea and DTT was used as solubilizing agent (A) and when GuHCl and DTT were used as solubilizing agent (B). White bars: Recovery when mass of protein found in the IB.SOL solution was used for calculation (equ. 1) Black bars: Refolding recovery when mass of protein found in the IB.RES solution is used for calculation.

Figure 5 is a graph showing the time required for a visible beginning clarification of a solubilization solution after addition of 4% NLS (white bars) and the time required until no further clarification was observed (black bars) for all tested mutants. Mutants are ranked according to the start time in ascending order.

Figure 6 is a variability chart for the response start of solubilization and indicates number of cysteines, number of linker elements and if the heavy (vh) or light chain (vl) fragment was at the N-terminus. 1: Mutant Myc 106 had the fastest solubilization start but contained 5 cysteines.

Figure 7 shows chromatograms as an overlay of REF end samples of Mutants MYC 135, Myc 130, Myc 133, Myc 119, Myc 123 wild type and Myc 116.

Figure 8 shows chromatograms as an overlay of REF end samples of Mutants MYC 134, Myc 137, Myc 138, Myc 106 Myc 136, Myc 123 and Myc 139.

Figure 9 shows scaled estimates and a prediction profiler of the following parameters: linker length, number of cysteines and Vh/Vl arrangement for the response retention time of mutants. The scaled estimates predict to what extent the retention time would shift when the parameter is increased from centerpoint (the red number in the prediction profiler plot on the x-axis) to a higher level.

Figure 10 is a plot of linker length versus retention time measured in RP-HPLC (RPC2) for tested mutants. The early retention time of MYC 130 compared with the other mutants is highlighted.

Figure 11 shows a normalized overlay of all REF.END samples from Figures 7 and 8 for estimation of peak area from peak 2.

Figure 12 shows a RP-HPLC 2 chromatogram overlay of a REF.End sample of MYC 119 solubilized with 8M urea +DTT, 8M urea, 6M GuHCl +DTT and 6M GuHCl dilution was 1:50 with a buffer containing 20mM Tris, 2mM cysteine, 1% NLS, pH 9.0.

Figure 13 is an RPC 2 chromatogram of a REF.End sample of MYC 119 after solubilization with 6M urea and 5mM DTT and subsequent refolding by a 1:10 dilution.

Figure 14 is an image of a gel following SDS Page analysis of REF.IM and REF.END sample of MYC 119 after solubilization with 6M urea and refolding by a 1:10 and 1:50 dilution, respectively. Lanes 1-8: non reducing SDS Page, lanes 9-14: reducing SDS Page. R= reducing; n-r = non reducing

Figure 15 is an RP-HPLC chromatogram overlay (RPC 2) of an inclusion body sample from mutant MYC 119 after solubilization with 6 M urea (black) and 4 % NLS (blue).

Figure 16 shows images of: left gel: Reducing (r) SDS-Page for Mutants MYC 118, 119, 130, 133, 134, 135 and 137; and right gel: Non-reducing (n-r) SDS Page of the same samples

Figure 17shows images of:: left gel: Reducing SDS-Page for Mutants MYC 106, 123 wt, 136, 138, 139 and 140; and right gel: Non-reducing SDS Page of the same samples

Figure 18 is an overlay of SEC HPLC 0.5% NLS chromatograms of REF.End samples for the mutants Myc 118, Myc 119, Myc 130, Myc 133 and Myc 135. IBs from these mutants were isolated at bench scale.

Figure 19 is an overlay of SEC HPLC 0.5% NLS chromatograms of REF.End samples for the mutants Myc 134, Myc 136, Myc 137, Myc 138, Myc 139, Myc 140, Myc 106 and Myc 123 wild type. IBs from these mutants were isolated in the pilot plant.

Figure 20 shows a scatter plot and linear regression (continuous line) of measured MW versus theoretical MW of REF.End samples for all mutants. The 95% confidence interval for the fit is also shown (dashed line). The dot at top left shows MYC 130. The dots within the dashed lines are within the 95% CI and therefore not significantly different from the wildtype. The dots below both dashed lines represent mutants with lower average MW than predicted and the dots above both dashed lines represent mutants where a higher average MW was measured than predicted.

Figure 21 shows SEC-HPLC (formulation) chromatograms for REF.END samples of Myc 119, Myc 106-origami, Myc 123 wt and Myc 137 after UFDF against 50mM Tris, pH 9.0 buffer. Samples were taken after each volume reconstitution. Sample prior to UFDF treatment (5), after 1st 'buffer exchange step (2), 2nd buffer exchange step (3), 3rd (4) and last (5) step.

Figure 22 shows RP-HPLC 2 chromatograms of REF.IM, REF.3T and REF. END samples for all tested mutants:

Brief Description of the Sequence Listings

SEQ ID NO. 1 is Myc123

SEQ ID NO. 2 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 1

SEQ ID NO. 3 is Myc102, Mycograb-6H-TAA

SEQ ID NO. 4 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 3

SEQ ID NO. 5 is Myc101, Mycograb-TAA

SEQ ID NO. 6 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 5

SEQ ID NO. 7 is MycC29X-TAA, e.g.: Myc105, MycC29Y-TAA

SEQ ID NO. 8 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 7

SEQ ID NO. 9 is MycC29X-6H-TAA, e.g.: Myc106, MycC29Y-6H-TAA, Myc113, MycoC29S-6H-TAA

SEQ ID NO. 10 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 9

SEQ ID NO. 11 is Myc107, Myco-4-TAA

SEQ ID NO. 12 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 11

SEQ ID NO. 13 is MycoC29X-4-TAA, e.g.: Myc108, MycoC29Y-4-TAA; Myc114, MycoC29S-4-TAA

SEQ ID NO. 14 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 13

SEQ ID NO. 15 is Myc109, N-Myco-4-TAA

SEQ ID NO. 16 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 15

SEQ ID NO. 17 is N-MycoC29X-4-TAA, e.g.: Myc110, N-MycoC29Y-4-TAA

SEQ ID NO. 18 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 17

SEQ ID NO. 19 is Myc111, N-Myco-6H-TAA

SEQ ID NO. 20 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 19

SEQ ID NO. 21 is N-MycoC29X-6H-TAA, e.g.: Myc112, N-MycoC29Y-6H-TAA

SEQ ID NO. 22 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 21

SEQ ID NO. 23 is Myc115, MycYSSS

SEQ ID NO. 24 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 23

SEQ ID NO. 25 is Myc116, MycYSIQSS

SEQ ID NO. 26 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 25

SEQ ID NO. 27 is Myc117, MycSIQKS

SEQ ID NO. 28 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 27

SEQ ID NO. 29 is Myc118, VH-2Bam-2VL

SEQ ID NO. 30 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 29

SEQ ID NO. 31 is Myc119, VL-2Bam-2VH

SEQ ID NO. 32 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 31

SEQ ID NO. 33 is Myc145, MycC98X-6H-TAA

SEQ ID NO. 34 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 33

SEQ ID NO. 35 is Myc129 (MycYSRIQSS)

SEQ ID NO. 36 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 35

SEQ ID NO. 37 is Myc130 (MycYSRSIQSSKS)

SEQ ID NO. 38 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 37

SEQ ID NO. 39 is Myc133

SEQ ID NO. 40 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 39

SEQ ID NO. 41 is Myc134

SEQ ID NO. 42 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 41

SEQ ID NO. 43 is Myc135

SEQ ID NO. 44 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 43

SEQ ID NO. 45 is Myc136

SEQ ID NO. 46 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 45

SEQ ID NO. 47 is Myc137

SEQ ID NO. 48 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 47

SEQ ID NO. 49 is Myc138

SEQ ID NO. 50 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 49

SEQ ID NO. 51 is Myc139

SEQ ID NO. 52 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 51

SEQ ID NO. 53 is Myc140

SEQ ID NO. 54 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 53

SEQ ID NO. 55 is Myc141

SEQ ID NO. 56 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 55

SEQ ID NO. 57 is Myc142

SEQ ID NO. 58 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 57

SEQ ID NO. 59 is Myc143

SEQ ID NO. 60 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 59

SEQ ID NO. 61 is Myc144

SEQ ID NO. 62 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 61

SEQ ID NO. 63 is the nucleotide sequence encoding the heavy chain of the wild type Myc123 scFv peptide.

SEQ ID NO. 64 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 63

SEQ ID NO. 65 is the nucleotide sequence encoding the light chain of the wild type Myc123 scFv peptide.

SEQ ID NO. 66 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 65.

SEQ ID NO. 67 is the nucleotide sequence of the pelB signal sequence.

SEQ ID NO. 68 is the peptide sequence encoded by SEQ ID NO. 67.

SEQ ID NO. 69 is the epitope from Candidal hsp90 for which the scFv peptide of SEQ ID NO. 2 (Mycograb) is specific.

SEQ ID NO. 70 is the epitope of a scrambled peptide used in the binding assay of Example 2.

Experimental

Example 1

E. coli host cells are transformed with the expression vector and cultivated in submers culture. At suitable OD600, expression of scFv is induced by derepression or activation of the inducible promorter (i.e. tac, trc or T7-lac promoter). This induction leads to accumulation of scFv in the host cell, resulting in production of insoluble inclusion bodies mainly made of aggregated scFv. After a suitable expression period, cells are harvested by centrifugation and disrupted. The insoluble inclusion bodies are subsequently isolated by gravimetric means.

The DNA sequences set forth in SEQ ID NO. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59 or 61 are inserted into an expression vector suitable for E. coli (i.e. pET). The protein is expressed in a Escherichia coli host and then purified by affinity chromatography. Standard molecular biology protocols are employed (see, for example, Harlow & Lane, supra; Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Sambrook, J. & Russell, D., 200 1,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).

After intracellular expression the scFv peptides are accumulated in the form of inclusion bodies within the E. coli cells. For purification, inclusion bodies are isolated and the product is extracted by solubilization and refolding. Purification to over 95% purity is achieved by ion exchange chromatography and immobilized metal affinity chromatography (IMAC).

Example 2 – ELISA Activity Assay

1. Summary

The binding activity of MYC123 ("wild type" Mycograb) and mutant Mycograb peptides was detected in an ELISA using the peptide epitope of hsp 90 as antigen. Mycograb or mutant Mycograb became bound to biotinylated peptide, which in turn was bound to streptavidin-coated microtitre plates. A scrambled peptide was used as a control sequence. Detection was accomplished using a peroxidase conjugated anti-His antibody, which binds to the His region of the MYC123 protein. The peroxidase reacted with the ABTS substrate to produce a green substance, the absorption of which was measured at 405 nm. The absorption at 405 nm is proportional to the activity of MYC123 in the solution. The activity was determined from the 6-point calibration curve for a reference standard and was indicated as % activity compared with the reference.

The principle of the ELISA is depicted in Figure 2 in which Streptavidin 1 is coated on a plate and is bound to biotin 2. The biotin 2 is, in turn, bound to the Hsp 90 peptide 3 which is located in the Hsp90 binding site 4 of the MYC123 scFv peptide 5. The scFv peptide 5 has a His tag 6 to which becomes bound the Anti-His-Peroxidase detection antibody 7.

2. Principle and Source of Procedure

The ELISA utilised was a direct detection assay where Mycograb or mutant Mycograb was captured using a streptavidin surface microplate coated with a biotinylated antigenic peptide (Biotin-NKILKVIRKNIVKK – epitope sequence from candidal

Hsp90). The presence of Mycograb or mutant Mycograb was then detected using an anti-His tag antibody conjugated to horse radish peroxidase. ABTS, a substrate for the horse radish peroxidise, was then added to the wells, and the concentration of Mycograb present was proportional to the absorbance measured at 405nm. The activity of samples of Mycograb or mutant Mycograb was determined directly from a standard curve generated using the pre-existing Mycograb drug product reference material.

3. Materials

3.1 Equipment

Streptawell High Bind microtitre plates were supplied by Roche (Cat No.11989685001). Assays were performed using a Bio-Rad Model 680 microplate reader. Hardware control was performed using the Microplate Manager Software version 5.2.1 (Bio-Rad, USA). Data analysis was performed using Microsoft Excel.

3.2 Chemicals and Reagents

3.2.1 Chemicals

All chemicals were of analytical grade unless otherwise stated.

Tris.....	Sigma T6791
Bovine Serum Albumin.....	Sigma A7030
Concentrated Hydrochloric acid.....	Sigma 32033-1
Phosphate Buffered Saline Tablets....	Sigma P4417
Tween 20.....	SigmaUltra P7949
Anti-His tag antibody HRP conjugate	Sigma A7958
ABTS.....	Sigma A3219
Biotin- NKILKVIRKNIVKK (SEQ. ID NO: 69)	Pepceuticals, UK
Biotin- SFKWGVTTSLSYFPK (SEQ. ID NO: 70)	Pepceuticals, UK

Water, Milli-Q water 18.2MΩfiltered 0.22μm pore size.

3.2.2 Reagents

Blocking buffer Stock 1 (5% w/v BSA in Milli-Q water)

BSA.....2.5g

Weighed out 2.5g of BSA and added to 50mL of Milli-Q water. Store at 4°C for 1 week.

1M Tris buffer pH 7.8

Tris.....121.24g

Weighed out 121.24g Tris and dissolved in 950ml Milli-Q water with stirring. Checked and adjusted pH with drop-wise addition of Concentrated Hydrochloric Acid until pH was 7.8. Made up to 1litre with Milli-Q water. Filtered through a 0.22µm filter (Sartorius) and stored at room temperature for up to 1 month.

Sample Diluting Buffer (20mM Tris pH 7.8 0.1% w/v BSA)

1mL of 1M Tris stock solution was added to 48ml of Milli-Q water and 1ml of Blocking buffer Stock 1 solution. Made fresh for each experiment.

Wash Buffer (PBS + Tween 20 0.1% v/v)

Dissolved 5 PBS tablets in 900mL of Milli-Q water, added 1mL of Tween 20, stirred until tablets had dissolved and made up to 1000mL with Milli-Q water. Stored at 4°C for up to 1 week.

Blocking buffer Stock 2 (Wash Buffer + 5% w/v BSA)

BSA.....2.5g

Weighed out 2.5g of BSA and dissolved in 50mL of Wash Buffer. Stored at 4°C for 1 week.

Peptide Diluting Buffer (PBS + 0.1% v/v Tween 20 + 0.1% w/v BSA)

1mL of Blocking buffer Stock 2 was added to 49mL of Wash buffer. Made fresh for each experiment.

Antigenic peptide solution

Biotin-NKILKVIRKNIVKK peptide.....10mg.

A 2mg/ml solution of the custom synthesised antigenic peptide solution was made up by weighing out 10mg of peptide and dissolving it in 5ml of Milli-Q water. 50-100µl

aliquots were dispensed into 1.5ml Eppendorf tubes and stored frozen at -80°C for up to one year.

Antigenic peptide Working Solution (4µg/mL peptide in Peptide Diluting Buffer)

25µL of Antigenic peptide solution (2mg/mL) was added to 12.475mL of Peptide Diluting Buffer to give a 4µg/mL solution. Made fresh for each experiment.

3.2.3 Sample Preparation

Control Article

Resuspended 1 x 10mg Mycograb reference batch (BN270603) in 5ml of Milli-Q water, mixed gently to ensure all the powder in the vial was incorporated and dissolved. Centrifuge at 13,000rpm for 5 minutes to remove any particulate matter. The protein concentration of this solution was then determined according to the standard UV protein concentration procedure.

Test Article

Resuspended 1 x 10mg Mycograb or mutant Mycograb test material in 5ml of Milli-Q water, and processed in an identical fashion to the Control Article.

Calibration curve standards

Control Article material was diluted in Sample Diluting buffer to give 5mL of a 5µg/mL top concentration sample. This solution was then used to generate two-fold serially diluted samples each in a final volume of 2mL over a concentration range of 5-0.156µg/mL.

4. Procedure

1. An aliquot of the 2mg/ml stock solution of antigenic peptide was removed from the freezer and diluted 1:500 (25µl peptide in 12.5ml buffer) with PBS buffer containing 0.1%(w/v) BSA and 0.1%(v/v) Tween 20 to generate a working solution of 4µg/ml peptide. A 96 well high bind StreptaWell plate (Roche) was coated from rows B-H with 100µl of 4µg/ml biotin-NKILKVIRKNIVKK peptide in 0.1% (w/v) BSA PBS-0.1%

(v/v) Tween 20. 100µl per well of 0.1% (w/v) BSA PBS-0.1% (v/v) Tween 20 were added to all wells in Row A. The plate was then stored overnight at 4°C.

2. The plate wells were then washed 3x 30sec with 200µl of PBS 0.1% (v/v) Tween 20 buffer on a Thermo WellWash AC.

3. Mycograb and mutant Mycograb samples were prepared prior to loading by diluting down to 5µg/ml in 20mM Tris buffer pH 7.8, 0.1% (w/v) BSA from the resuspended Mycograb vial stock solution. Mycograb® samples were then prepared from this initial 5µg/ml solution by serial dilution x2 down to 0.15625µg/ml with 20mM Tris buffer pH 7.8, 0.1% (w/v) BSA. All the individual dilutions were performed in either 1.5ml Eppendorf tubes (VWR Cat No 211-2139) or 7ml Bijoux containers (VWR Cat. No. 215-0328), depending on the amount required for the experiment.100µl of each dilution sample was then loaded onto the plate in triplicate. A control set of blank wells containing 100µl 20mM Tris pH 7.8, 0.1% (w/v) BSA was also included in Row H.

4. The plate was left at room temperature for 1 hour and the wells then washed 3 times with PBS-0.1% (v/v) Tween 20 as described in step 2.

5. 100 µl of mouse monoclonal Anti-His HRP conjugate (Sigma A7058) was loaded into each well at a concentration of 1:2000 in 0.1% (w/v) BSA PBS-0.1% (v/v) Tween 20 and left for 1 hour at room temperature.

6. Wells were then washed as described above and the bound Mycograb® detected by the addition of 100µl of ABTS® reagent. The colourimetric development was read at 405nm with readings taken when the absorbance of the highest concentration samples in the second calibration curve reached 1.3 AU. The concentration of Mycograb® was proportional to the absorption at A405nm.

7. The A405nm absorbance results for the reference material were transferred into an Excel spreadsheet and a 6-point second order calibration function $y = a + bx + cx^2$ was plotted from the reference sample A405nm minus blank versus concentration of

Mycograb® in µg/ml with a correlation coefficient of ≥ 0.99. If an observed 'hook' effect existed, the highest concentration point was removed from the graph, leaving a 5-point calibration curve. Two individual well outliers (as determined by eye) per plate was removed from the data analysis under some circumstances, provided that there is no more than one outlier per triplicate measurement. Percentage activity was calculated using non-linear regression analysis to calculate apparent concentrations in the samples using the appropriate absorbance means.

The ELISA results obtained during the study are shown in Table 1.

Table 1

Sample information				**Bioassay data**	
No.	**Sample**	**Sample info**	**Buffer composition**	**ELISA Site 1 [%]**	**ELISA Site 2 [%]**
1	MYC123 WT DF.R	Wild type	50 mM Tris, pH 9.0	71	95
2	DP (#140602)	Wild type	0.5 M urea, 0.2 M L-arginine pH 9.5	90	78
3	MYC123 WT DOW.FT	Wild type	50 mM Tris, 1 M sucrose, ~0.2% Tween20, 3 mM DTT, pH 3.0	135	130
4	MYC123 WT DOW.FT	Wild type	50 mM Tris, 3 mM DTT, pH 9.0	85	131
5	MYC C28Y DF.R	C28Y	50 mM Tris, pH 9.0	76	91
6	MYC C28Y DOW.FT	C28Y	50 mM Tris, 3.3 mM DTT, pH 9.0	79	98

Samples 1 and 3-6 are process intermediates (not final drug substance) obtained after prepurification of inclusion bodies, refolding and removal of detergent NLS (by Dowex chromatography or diafiltration). Sample 2 is an original wild type drug product produced by Biomeva/Thymoorgan and used in Phase III trials. The specification for the original drug product was 75 – 125% of the reference standard. All samples were judged as active (binding).

Example 3 - Minimum inhibitory concentration determination of *Cryptococcus neoformans*

Summary

In the MIC assay the antimycotic activity of MYC123, using *Cryptococcus neoformans* as model organism, was determined. This assay measures antifungal activity and may mimic the action of MYC123 in the clinical setting.

The MIC of MYC123 was determined by broth micro dilution according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards document M27-A2 (2002). Briefly: RPMI medium was inoculated with 10^3 CFU/ ml of *C. neoformans*. MYC123 was added in decreasing concentrations to the medium (1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml ...). The MIC plates were incubated at 37°C for 72h. The endpoints were determined as the concentration to produce optically clear wells (MIC-0) and the concentration resulting in a prominent decrease in turbidity (≥ 50% growth inhibition, MIC-2) compared with the growth control.

Method

Pre-Assay Preparation

Safety cabinet: A SAB plate was inoculated with *C.neoformans* and incubated for 48-72hr at 35°C. The plate was sealed with parafilm.

Bench:

RPMI was prepared. Antifungal agents were prepared according to NCCLS methodology (M27-A2) – total of 11 concentrations in RPMI growth medium. Concentrations were at 2x the final concentration required for single MIC

MIC Plate

In a U-shaped 96-well plate – 100µl of the highest drug concentration to be tested (2x required concentration) was added to well 1 of rows A and B (assay done in duplicate).

This was repeated across the columns on the plate with descending concentrations e.g. next concentration well 2 of rows A + B, next concentration well 3 of rows A + B. Well 12 contained growth medium only.

Safety Cabinet: Inoculum Preparation – Direct colony suspension. A direct colony suspension of *Cryptococcus neoformans* was made from a 48-72hr old plate into RMPI medium. This was adjusted to 0.5 MacFarlands standard (approx $1x10^6 - 5x10^6$ cfu/ml). A 1:50 dilution was made. A further 1:20 dilution (approx $1x10^3 - 5x10^3$ cfu/ml, 2x inoculum required) was made

Safety cabinet: Plate inoculation. The plate was worked from well 12 to well 1. This avoided drug carryover. 100µl of inoculum suspension was pipetted into each well (final inoculum ($0.5x10^3 - 2.5x10^3$ cfu/ml). Plates were sealed with parafilm.

Incubation

The MIC plates were incubated at 37°C for 72hrs. To check the inoculum, the inoculums suspension were serially diluted and 10µl of the dilutions were plated out onto a SAB plate and incubated at 37°C for 72hrs.

Reading Results

Using a reading mirror; growth was compared with that of the 'no-drug' control (well 12) and growth scored as follows:

0 – optically clear
1 – slightly hazy
2 – prominent decrease in growth (approx 50%)
3 – slight reduction in turbidity
4 – no reduction in turbidity

MIC results obtained during the study as shown in Table 2

Table 2

Sample information				Bioassay data
No.	**Sample**	**Sample info**	**Buffer composition**	**MIC25.02.2008/29.02.2008 [µg/ml]**
1	MYC123 WT DF.R	Wild type	50 mM Tris, pH 9.0	128
2	DP (#140602)	Wild type	0.5 M urea, 0.2 M L-arginine pH 9.5	64
3	MYC123 WT DOW.FT	Wild type	50 mM Tris, 1 M sucrose, ~0.2% Tween20, 3 mM DTT, pH 3.0	16
4	MYC123 WT DOW.FT	Wild type	50 mM Tris, 3 mM DTT, pH 9.0	64
5	MYC C28Y DF.R	C28Y	50 mM Tris, pH 9.0	64
6	MYC C28Y DOW.FT	C28Y	50 mM Tris, 3.3 mM DTT, pH 9.0	64
	Reference 070602		0.5 M urea, 0.2 M L-arginine pH 9.5	128/64
	Buffer FB		0.5 M urea, 0.2 M L-arginine pH 9.5	512 or 256
	Buffer Tris		50 mM Tris, pH 9.0	>512
	Buffer 6		50 mM Tris, 3 mM DTT, 1 M sucrose, 0.2% Tween20, pH 3.0	16

Samples 1 and 3-6 were process intermediates (not final drug substances) obtained after prepurification of inclusion bodies, refolding and removal of detergent NLS (by Dowex chromatography or diafiltration). Sample 2 was on original wild type drug product produced by Biomeva/Thymoorgan and used in Phase III trials.

The MIC results obtained for the samples were compared with the results obtained for the corresponding buffer. All the samples were regarded active in comparison to the Reference 070602 besides sample 3. Sample 3 and the Buffer 6 gave the same results demonstrating that the buffer without MYC123 was toxic for the test organism. Values

for the samples 1 and 4-6 were far from the values for Buffer Tris which indicates an increased reliability of the data.

Example 4

Summary

The aim of the Mycograb mutants was to obtain a mutant scFv peptide with improved structural properties compared with the wild type Mycograb. It was believed that through point mutations, especially the replacement of free cysteine by tyrosine, aggregation and formation of incorrect disulfide bonds during down stream processing should be reduced. It was also believed that exchanging the orientation of the heavy chain fragment with the light chain fragment and removing the HIS-Tag is be beneficial for formation of a native 3D structure of the Mycograb molecule.

After cloning, the constructs were sequenced prior to fermentation. The fermentation was scaled up to deliver enough material for inclusion body (IB) isolation and for further downstream processing. The expression constructs of the mutants were purified according to the adapted Biomeva process until the refold end step.

The physical parameters of a range of mutant Mycograb peptides was tested as set out in Examples 5 to 12.

An overview of the mutants tested and their mutations is given in Table 3. The wild type was included in the studies for comparison reasons.

Table 3: Name and structural properties of the 12 investigated Mycograb mutants and the wild type (myc 123)

MUTANT	HIS tag	Linker length	VH-VL alignment	cysteines	additional mutations
MYC118	NO	4X	VH N-terminal	5	
MYC 119	NO	4X	VL N-terminal	5	
MYC 130	NO	3X	VH N-terminal	4	C29Y,I30S, H69R, N86S, V139I, V140C F147S, F151S, A176K, N213S
MYC 133	NO	5X	VH N-terminal	5	
MYC 135	NO	5X	VL N-terminal	5	
MYC 134	NO	6X	VH N-terminal	5	
MYC 137	NO	4X	VH N-terminal	4	C29Y, I30S
MYC 138	NO	5X	VH N-terminal	4	C29Y, I30S
MYC 106 origami	YES	3X	VH N-terminal	4	oxidatives cytoplasma
MYC 136	NO	6X	VL N-terminal	5	
MYC 139	NO	6X	VH N-terminal	4	C29Y, I30S
MYC 123 Wt	YES	3X	VH N-terminal	5	
MYC 140	NO	4X	VL N-terminal	4	C29Y, I30S

The methodology used in the test assays will now be described.

Inclusion body (IB) isolation

4 L of fermentation broth obtained in LVA (Laborversuchsanstalt) from shake flask culture of Mutants Myc 118,119,130,133 and Myc 135 were disintegrated with a high pressure homogenizer (LAB 40-15 RBFI) in RPP4 at 700 Bar for 2 cycles of 15 min each. The IBs were separated from the cell debris at lab scale with a bottle centrifuge at 10 000 rpms for 20 min at 4°C. IBs were washed twice with water for laboratory use (WFL) and afterwards, a 20% (w/v) suspension in WFL was prepared. The suspension was stored in aliquots at -20°C.

IBs from mutants Myc 134,137,138,106,136,139,140 and Myc 123 (wt) were isolated at pilot scale in RPP4 because fermentation of these mutants was done at 30L scale in bioreactors. IBs were separated from cell debris with a disc stack centrifuge. A 20% suspension (w/v) in WFI was prepared. This suspension was stored in aliquots at -20°C.

Solubilization

Solubilization with NLS (according to adapted Biomeva process). Solubilization of the 20% IB suspension was done by dilution with WFL to a protein concentration of 8 mg/ml followed by a 1:2 dilution with 100mM Tris/Base, 4% NLS, pH 9.0 buffer. The solution was stirred at room temperature in a beaker until clarification but at least for 30 min. The time until start and end of clarification was recorded.

Alternative Solubilization with Urea, GuHCl, DTT. The alternative solubilization strategy was performed by a 1:10 dilution of a respective volume of 20% IB suspension with 20mM Tris 8M Urea +/- 5mM DTT or 20mM Tris, 6M GuHCl +/- 5mM DTT both at pH 9.0. The resulting concentration of urea and GuHCl was 7.2M and 5.2M respectively, due to the volume of the IB suspension solution.

Refolding of solubilized IB's

Refolding with NLS. The refold was done by 1:4 dilution of the solubilization solution with a 50mM Tris/Base buffer. The final concentration of NLS was 0.5%. Refolding was initiated by addition of 50µM $CuCl_2$. Samples were taken and immediately submitted for RPC2 analysis prior and after $CuCl_2$ addition, then approximately 24, 48, 72 and 96 hours after $CuCl_2$ addition.

Refolding after solubilization with Urea, GuHCl. Refolding of a Mycograb solution after solubilization with 8M urea or 6M GuHCl +/-DTT was performed by 1:50 dilution with a buffer containing 20mM Tris/Base, 1% NLS and 2mM Cystin at pH 9.0.

For some mutants, dilution of a Mycograb solution after solubilization with urea by 1:10 with a buffer containing 20mM Tris/Base, 0.5M L-arginine and 2mM Cystin at pH 9.0 was also performed.

The refold solution was stirred for 96 hrs at 4°C or 24hrs at RT, respectively.

Refolding kinetics

A refold kinetic was recorded for mutant Myc 119 in order to determine the required refolding time. A sample of a 20% IB suspension of Myc119 was solubilized as described above. Refolding was performed as described above, but samples were taken at respective time intervals and analyzed by RPC 2.

NLS removal by UF/DF from refolding solution. Mutants Myc119, Myc 137, Myc 106 and Myc 123 (wt) were solubilized and refolded as described above. After refolding, a buffer exchange of REF.END solution was performed with an Amicon stir cell with 10kDa molecular weight cut-off. NLS concentration after each turn over volume was determined with RP-HPLC. 50 ml of REF.END solution were concentrated to 25ml and then filled up again to 50ml with diafiltration buffer. This procedure was carried out 4 times. Aggregation tendency after NLS removal was measured with SEC-HPLC running with formulation buffer.

SDS Page analysis

SDS Page was performed using NuPAGE 4-12 BisTris gels and MOPS as running buffer. The run time was 65 minutes at 200 volt. A mass of 0.2-0.4 µg Mycograb was applied on each lane. After electrophoresis, the gels were stained with silver. For reducing SDS Page, 100 mM DTT was added to the sample.

Results

The expression construct of the mutants was analyzed at different stages in the down stream procedure with the analytical methods listed in Table 4:

Table 4. Code and description of process intermediates and the respective analytical assay

CODE	Intermediate description	Analytical method
IB.RES	Resuspension of IB's (20%w/v)	RPC 1
IB.SOL	Solubilized IB's	RPC 1, RPC 2
REF.IM	Refold intermediate prior to $CuCl_2$ addition	RPC1, RPC 2
REF.END	Refold solution, endpoint	RPC 1, RPC 2, SEC 0,5%NLS, SDS PAGE red/non red, Pep-map, denat. SEC

Table 5 gives a description of the analytical methods listed in Table 4 that were used for evaluation of the mutants. A comment is included describing the specificity of the particular assay.

Table 5: Analytical method, the respective response and Unit of Measurement (UoM) for the assays used to evaluate the mutant samples.

Analytical method	Response	UoM	Comment
RPC 1	total protein mass	mg/ml	This assay is not specific for Mycograb. Sample is dissolved with SDS, DTT and urea
RPC II	chromatogram	$t_{R\ (monomer)}$ [min]	Assay can only be evaluated by overlay of chromatograms. Shift of the 'monomeric peak' indicates refolding
SEC 0,5% NLS	average molecuar weight	kDa	For samples containing 0,5% NLS. RT of peak maximum is correlated to MW. Broad elution peak from 43 -900kDa
SDS Page reducing	Monomeric/Dimeric band; Impurity content	band	Non-covalent aggregates are dissolved by reduction; in comparison to non reducing gel, semi-quantitative evaluation about aggregate content possible
SDS Page non-reducing	Monomer and aggregate bands	band	
Pep Map	Disulfide bridging	no, weak, strong and very strong signal	Ability to detect peptides depends on the sensitivity of the measuring device
SEC Formulation	average molecuar weight	kDa	For samples in a similar matrix as formulation buffer. RT of peak maximum is correlated to MW.
RPC NLS	NLS concentration	mg/ml	

Further details of the respective assays for the investigated mutants are summarized and discussed in the following Examples 5 to 12.

Example 5 - Mass balance after solubilization and refolding - results RPC1 titer determination

Protein concentration prior and after solubilization and refolding of IB's was measured with the titer assay. As this assay measures all soluble protein present in the sample, mass balance should yield 100%. Mass balance for solubilization was calculated using equ.1.

$$\% \ Sol = \frac{mg_{RPC1}\text{IB.SOL}}{mg_{RPC1}\text{IB.RES}} \qquad \text{equ. 1}$$

where mg_{RPC1} *IB.SOL* is the mass of protein in the solubilzation solution of the IB's calculated from concentration measurement by RPC 1 method and volume of IB SOL solution. mg_{RPC1} *IB.RES* is the mass in the 20% IB suspension calculated from concentration measurement by RPC 1 method and volume of the solution after resuspension of the isolated IB's in DI.

Mass balance for refolding was calculated using equ.2 and is expressed as % recovery. IB's solubilized with either 4% NLS, 8 M urea+/- 5mM DTT or 6M GuHCl +/-5mM DTT were diluted and refolded as described in 3.3.1 and 3.3.2, respectively.

$$\% \ \text{Ref} = \frac{mg_{RPC1}\text{Ref.END}}{mg_{RPC1}\text{IB.SOL}} \qquad \text{equ. 2}$$

where mg $_{RPC1}$ Ref.END is the mass of protein according to concentration measurement with RP-HPLC found in the refolding solution times volume of refolding solution. mg $_{RPC1}$ IB.SOL is the mass of protein found in the IB solubilisate, % REF is the recovery after refolding.

Mass balance after solubilization with 4% NLS and subsequent refolding of all mutants as calculated by equations 1 and 2 are illustrated in Figure 3. Raw data can be found in Tables 6 and 7.

Table 6 shows the recovery after solubilization with NLS of the IB_RES suspension and recovery after refolding calculated from analytical method RPC I for all tested mutants. Also shown is the protein concentration in the IB-RES solution and protein concentration in the refolding solution determined by analytical method RPCI. Table 7 shows protein concentration determined by RPC I of IB_RES, IB_SOL and REF.END samples after solubilization with urea (SOL:urea) and solubilization with GuHCl (SOL:GuHCL).Refolding time was 96hrs at 4° C. The dilution factor was 500 and 50 for IB_RES and IB_SOL, respectively to yield the REF.END solution.

Table 6

Mutant #	c [mg/ml] IB_RES	Recovery solubilization (%)	c [mg/ml] ref.end	Recovery refolding (%)
MYC 138	27.2	110	1.18	72
MYC 123wt	54.9	138.75	1.65	99.2
MYC 140	18.7	105.55	1.46	82.8
MYC 137	19.2	150.25	1.83	83.7
MYC 139	19.9	138.66	1.82	84.2
MYC 119	13.6	152.27	1.59	84.84
MYC 118	19.8	136.1	1.77	89.8
MYC 136	15.1	141.5	1.76	90.1
MYC 133	16.3	117.175	2.09	94.1
MYC 135	11	135.65	1.82	96.3
MYC 134	35.9	77.35	2.73	99.1
MYC 106	13.7	124.75	2.95	87.1
MYC 130	19.4	87	1.84	92.9

Table 7

			SOL: urea	SOL: GuHCl
Mutant #	c IB_RES	c IB_SOL	c REF.end	c REF.end
MYC 118	19,8	2	0,091	0,075
MYC 119	13,6	3,46	0,07	0,056
MYC 130	19,4	2,94	0,044	0,026
MYC 133	16,3	1,34	0,023	0,0193
MYC 135	11	1,41	0,035	0,042

Mass balance of solubilization was exceeding 100% for 10 of the 12 investigated mutants. This could be due to the fact that the IB suspension was a crude sample type and eventually, the IB's were not completely dissolved when the sample was taken, leading to an inhomogeneous solution and thus underestimating total protein concentration. Data variability is high, with a relative standard deviation for 6 mutants analyzed twice ranging from 2.6% (Myc 138) to 42.9% (Myc 133).

% Recovery after refolding was between 72% (Myc 138) and 99% (Myc 134). The expected recovery is 100% (similar to recovery after solubilization). Recoveries after refolding were all lower than 100% and scatter not as much as for recovery after solubilization. This indicates that estimation of protein concentration in IB.SOL and REF.end samples is more accurate than in IB.RES samples. However, calculation of recovery primarily serves as a control for solubilization and refolding experiments.

Refolding yields related to the solubilization solution IB.SOL and the IB suspension IB.RES when 8M urea or 6M GuHCl was used as solubilization agent are shown in Figure 4.

The recovery varies from 44% to 230% reflecting the problems with measurement of protein concentration especially in IB.SOL and IB.RES samples, possibly due to insufficient homogenization prior to sampling.

Concentration in the REF.END samples after urea solubilization was comparable to concentration in REF.END after GuHCl solubilization (see Tables 6 and 7) though by an average factor of 1.2 higher. Dilution was thus consistent.

Example 6 - Solubilization time

Solubilization time with NLS was studied for all mutants. The time until the solution started to become clear and the time until no further clarification could be observed was recorded and is illustrated in Figure 5.

In contrast to using 2% NLS, solubilization with Urea +/- DTT and GuHCl +/-DTT was 2-3 times faster.

A correlation between the number of Cysteines and time required for clarification to start was found. With the exception of mutant 134 (5 cys), mutants with 4 cysteine residues solubilized faster than mutants with 5 cysteine residues. Figure 6 shows a variability chart where START [min] of clarification is plotted versus the 3 categories:

alignment of heavy or light chain fragment at the N-terminus, number of linker elements and cysteine residues. With exception of Myc 134, indicated with 1 in Figure 6, data points in category with 4 Cysteines scatter around earlier solubilization start times than compared with data points in the category with 5 cysteines.

A regression model (R^2= 0.72 when Myc 134 is excluded) predicted that start of solubilization would decrease from 20 min to 11.3 min for a Mycograb construct with 4 cysteines instead of 5 (model not shown).

Example 7 - RPC 2- NLS refolds

Mycograb REF.END samples solubilized and refolded according to Biomeva adapted process (described in Example 4) mutants were analyzed by RPC 2.

An overlay of REF.END samples from all investigated mutants including the wild type (MYC 123) is shown in Figure 7 and Figure 8. Mutant Myc 116 was screened earlier in lab DSP-DEV 1 and was included in the overlay for comparison reasons.

In Figure 7, chromatograms of REF.END samples generated from IB's isolated at bench scale and in Figure 8, chromatograms of REF.END samples generated from IB's isolated at larger scale in the pilot plant are shown.

Elution profiles were compared with respect to:

1. Retention time peak 1, reflecting hydrophobicity
2. Shape of peak 1, reflecting presence of dimer and homogeneity of monomer species when the peak is sharp
3. Ratio area of monomer/dimer peak (peak1) to aggregate/impurity peak (peak 2), reflecting aggregate/impurity content

Retention time peak 1, reflecting hydrophobicity

The retention time of the monomer/dimer peak for the tested mutants is listed in Table 8.

Table 8: Retention time [min] of peak 1 in RPC2 for the tested mutants and the molecule properties

Mutant	t, min]	linker	cystein	chain orientation
MYC 130	ave: 8,16 n=3; RSD=4,6%	3X	4	VH
MYC 106 origami	9,8	3X	4	VH
MYC 138	9,99	5X	4	VH
MYC 139	10,035	6X	4	VH
MYC 123_Wt	10,041	3X	5	VH
MYC118	10,075	4X	5	VH
MYC 137	10,116	4X	4	VH
MYC 134	10,26	6X	5	VH
MYC 140	10,526	4X	4	VL
MYC 119	10,535	4X	5	VL
MYC 135	10,558	5X	5	VL
MYC 136	10,637	6X	4	VL
MYC 133	10,659	5X	5	VH

Retention time varies greatly with molecule construct. There is no trend of retention time (reflecting hydrophobicity) increasing with linker length, as would be expected. One linker element consists of four Glycines and one Serine residue. Glycine is hydrophobic in contrast to Serine, which is hydrophilic. However, the 4x higher Glycine content in the linker seems not to significantly increase the hydrophobicity as measured by retention time in RPC 2.

Retention time of Myc 130 is shorter than for the rest of the mutants. 10 amino acids were replaced by amino acids of more hydrophilic (5 serines) nature, thus decreasing the hydrophobicity of the molecule und consequently resulting in earlier retention time. Excluding this data point from statistical analysis results in a model showing significant difference in retention time when the orientation of the VL is N-terminal compared to an orientation when its C-terminal. Retention time increases by 0.41 min when the VL element is located N-terminal compared with when its located C terminal. Figure 9 shows the scaled estimates and a prediction profiler of the model with number of cysteines, linker length and chain fragment orientation as factors and retention time as response.

Note that retention time of Myc 130 was excluded from the model. A plot of retention time versus linker length, shown in Figure 10, demonstrates that retention time for this construct is lower compared to the rest of the mutants because of point mutations resulting in more hydrophilic nature, as mentioned above.

Shape of peak 1

It is assumed that a sharp peak 1 with no or only little shoulders reflects the homogeneity of a monomeric Mycograb. Peak shape was assessed by overlays of the RPC 2 chromatograms of REF.End samples from all mutants and sharpest peaks were determined for the mutants Myc 137, Myc 138 and Myc 139. Peak1 was sharper than the wild type Myc 123 and peaks 1 and 2 were almost base-line separated. This may be an indication that these constructs express the monomeric/dimeric protein with greater homogeneity than the wild type.

Ratio area of monomer/dimer peak

Impurity/aggregate content in relation to monomer/dimer was lowest for Myc 116 and MYC123 wt as shown in Figure 7 (Myc 123 wt). However, analysis of these two samples was performed 3 months earlier by another laboratory and an increase of peak 2 was noticed over time. A chromatogram of REF.End sample from Myc 123 that was prepared and analyzed in the same month as REF.End samples of the tested mutants is shown in Figure 8. Comparison of the chromatogram of MYC 123 shown in Figure 7 with that of shown in Figure 8 leads to the conclusion that sample preparation and analytical method are not exactly reproducible.

The area ratio of monomer/dimer peak to aggregate peak was determined by normalizing peak 1 to the same peak maximum. The peak area of peak 2 after normalization was ranked according to increasing size using visual area estimation. The normalized overview is shown in Figure 11.

The following ranking could be established:

Myc 116, Myc 139, Myc 136 < Myc 119, Myc 12, Myc140 < Myc137, Myc 135, Myc138 < Myc106 < Myc130 < Myc 134 < Myc118 < Myc133

RPC 2 chromatograms of REF.End samples generated from IBs of mutants Myc 106, 134, 136-139 were processed in the pilot plant and showed lower impurity /aggregate peaks (cf Figure 8) than IB's of mutants Myc 118-135 isolated at bench scale.

Example 8 RPC 2 urea/GuHCl refolds

Mutants Myc 118, 119, 130 and Myc 133 were dissolved with 7,6M Urea +/- DTT and 5,6M GuHCl +/-DTT and refolding was initiated by dilution in refolding buffer.

All REF.End samples did not show the monomer/dimer peak (peak 1) in RPC 2. A huge peak 2, assumed to be aggregates and impurities is predominant. A representative RP HPLC chromatogram of a refold end sample from mutant Myc 119 is given in Figure 12. The sample was prepared as described in Example 4.

The monomer was expected to elute at approximately 10.5 min. Peaks eluting earlier are not identified and were not observed in refolds with 0.5% NLS. The huge peak 2 indicates strong aggregation. Similar elution profiles were obtained for all REF.End samples after urea/GuHCl solubilization.

Similar elution profiles were obtained when the refold was done by 1:10 dilution with a buffer containing 20mM Tris/Base, 0.5M L-arginine and 2mM Cystin at pH 9.0. A representative chromatogram is shown in Figure 13.

The strong aggregation tendency was confirmed by SDS-Page under non reducing conditions, a huge and intense HMW smear was detected for a REF.End sample, with no monomeric band visible after urea solubilization. This smear then disappeared when the sample was reduced and a monomeric Mycograb band appeared. In Figure 14, SDS Page analysis of a reduced and non- reduced REF.End sample after urea solubilization is shown. Lanes 4-7 show REF.IM and REF.End sample of MYC 119 under non-reducing conditions at 2 different dilutions. Lanes 10-13 show the same sample under

reducing conditions. The aggregate smear disappeared when the sample was reduced and the monomeric as well as the dimeric band became visible.

Urea and GuHCl were present in the refolding solution at low concentration (0.14M in case of a 1:50 dilution and 0.72M in case of a 1:10 dilution for urea; for GuHCl, it was 0.11M in case of a 1:50 dilution and 0.56M in case of a 1:10 dilution) cannot prevent the protein from aggregation. Using DTT does not seem to have a significant effect on aggregation as RP-HPLC chromatograms (RPC 2) with and without DTT looked comparable, as shown in Figure 12.

In contrast to the REF.End sample, RPC 2 chromatogram of a IB.SOL sample dissolved with urea was comparable in terms of peak shape with a IB.SOL sample dissolved in 2% NLS. Figure 15 shows an overlay of HPLC chromatograms.

SDS-Page analysis of a non-reduced IB.SOL sample showed stronger HMW bands when the sample was dissolved with urea than in case of a IB.SOL sample dissolved in 2% NLS. This is shown in Figure 14: in lane 3, the sample was solubilized with urea and in lane 8, the sample was solubilized with 2% NLS. It can be concluded that peak 2 in RP-HPLC does not give an indication about aggregate content since peak 2 of an chromatogram overlay is even smaller for an IB.SOL sample in urea than in NLS.

Subsequent refolding did not yield a monomeric peak but the protein completely aggregates.

Example 9 - SDS-PAGE reducing and non-reducing

Reducing and non-reducing SDS-Page was performed to determine impurities and aggregates content in REF.End samples. With reducing SDS-Page Mycograb species appeared as monomeric and dimeric band and host cell impurity content in the sample could be distinguished from aggregated species when compared to a non-reducing SDS-Page gel. Non-reducing SDS Page showed Mycograb monomers, dimers and aggregates. Comparing a non-reduced SDS-Page silver stain gel with a reducing SDS-Page analysis, the amount of aggregated species could be evaluated semi-quantitatively.

Reducing and non-reducing SDS -Page gels of REF.END samples of all tested mutants are shown in Figure 16 and Figure 17.

The gel in Figure 16 on the left side shows a reducing SDS-Page of REF.End samples from mutants MYC 118, 119, 130, 133, 134, 135, 137. The band at 30kDa is monomeric Mycograb and it is predominant in all samples. According to the migration of the monomeric band, Mycograb expressed in mutant MYC 134 seems to have higher molecular weight than the other mutants analyzed on the gel. The same but to a lesser extend was detected for MYC 135. According to Table 9, MYC 134 has the highest theoretical molecular weight among the mutants shown in Figure 16, followed by MYC 135.

In the non reducing SDS-Page gel, aggregated species as well as the dimer are visible. In lanes 13 (MYC 134) and 15 (MYC 137), HMW bands are fainter than in the other lanes. This would indicate a lower content of aggregated species, however, also the bands for the monomer are more faint.

Double bands of different migration time and intensity in comparison with each other were observed for all mutants with exception of Myc 133 shown in Figure 16. Identification of these bands was hardly possible, however it was assumed that it was Mycograb Monomer of native like structure.

Figure 17 shows a reducing and non –reducing SDS Page of REF.End samples from mutants MYC 106, 136,138,139,140 and the wild type, MYC 123. Differences in MW for the different constructs could be determined according to different migration of the monomeric band. The bands in lanes 5 and 7 appeared at a slightly lower MW than the bands in lanes 2,3,6 and 4 which was in agreement with the theoretical MW listed in Table 9.

The mass of protein applied to the gel was not consistent; monomeric bands varied in intensity because protein concentration determination in the REF.End sample was not accurate enough. Thus semi-quanitative analysis of impurity content was not possible. However, the higher impurity content in REF.end sample of Myc 106 was obvious as

the thickness of the monomeric band was comparable to one of Myc 140 but the intensity of the other bands was much higher.

SDS-Page analysis indicated that a REF.End sample of Myc 106 $_{origami}$ contained more HCP and product related impurities. However, this was not confirmed by RPC2 analytical method, where the area of peak 2 was in the same range as for the other mutants.

Example 10 - SEC 0.5% NLS : Determination of molecular weight of Mycograb species in the REF. END sample

All REF.END samples prepared according to the adapted Biomeva process (see Example 4) were analyzed with SEC- HPLC in 0,5% NLS and the average molecular weight was determined. An overlay of the SEC chromatograms is shown in Figure 18 and Figure 19.

The average molecular weight ranged from 48.6kDa to 65.8 kDa. The broadness of the peaks reflects the heterogeneity of species in the sample. Though approximately 80% of the product was monomeric in REF.End samples, dimers and higher MW species were present as well as non-product related impurities, resulting in a broad elution peak.

In Figure 18, the elution profile of Myc 130 sticks out because of increased fronting compared with the other investigated samples. This might have been due to increased heterogeneity in the sample because of the construct's nature (more hydrophilic) or due to an accidentally different sample treatment.

Samples shown in Figure 18 were prepared simultaneously and stored at 4°C for 5 days prior to analysis. Samples shown in Figure 19 were prepared simultaneously and stored at 4°C over night days prior to analysis. Samples seemed to be stable at 4°C as MW of the constructs were in a similar range.

Fronting of Myc 130 may have beem due to higher amount of aggregated species compared with the other investigated samples. However, peak 2 in the corresponding

RPC 2 chromatogram was not outstandingly large but it has been observed that there is only sometimes a correlation between increased MW determined by SEC 0.5% NLS and large peak 2 peak area, determined with RPC2.

Additionally, SDS-page of Myc 130 did not indicate a higher impurity content and increased heterogeneity of the sample. Other factors leading to fronting in SEC such as column overloading and increased temperature during analysis can be excluded as all samples were analyzed on the same day.

There was a very early retention time for Myc 130 in RPC2.

It was assumed that the average MW in a REF.End sample was increasing for an increasing amount of dimers, aggregates and impurities. The calculated MW of a monomeric Mycograb expressed in the different mutants was between 26 and 27kDa because of the different linker length and other mutations. A table listing theoretical MW- calculated from the amino acids-, MW of the REF.End sample determined by SEC, # of amino acids, linker length and number of cysteines is given in Table 9.

Table 9: SEC-HPLC 0,5% NLS results of REF.End samples from all tested mutants. The mutants are ranked according to their theoretical molecular weight.

MUTANT	**MW theory**	**SEC**	**# aa**	**Linker length**	**Number of cysteines**
MYC 130	26.1	65.8	246	3X	4
MYC 118	26.4	48.6	251	4X	5
MYC 137	26.466	47.1	251	4X	4
MYC 119	26.5	49.9	252	4X	5
MYC 140	26.55	49.3	252	4X	4
MYC 133	26.7	57.9	256	5X	5
MYC 138	26.78	51.0	256	5X	4
MYC 135	26.8	52.2	257	5X	5
MYC 136	27.018	64.6	261	6X	5
MYC 134	27.062	62.6	261	6X	5
MYC 139	27.09	64.7	261	6X	4
MYC 123Wt	27.32	63.5	256	3X	5
MYC 106 origami	27.38	61.5	256	3X	4

Theoretical MW was plotted versus MW determined by SEC and a linear relationship with a correlation coefficient of 0.77 was found when the data point for Myc 130 was excluded.

Mutants Myc 106, Myc 138 and Myc 135, represented by dots to the right of the lower dashed line in Figure 20, had a lower average MW than the wild type. Mutants Myc 133, 136 and 139, represented by dots to the left of the higher dashed line had a higher average MW than the wild type. However, assay variability has to be taken into account. Additionally, from Figure 19 it can be seen that the mass of injected protein was not always the same as peak area for some of the samples. Formation of covalent aggregates should be decreased for mutants with 4 cysteines as compared with Mycograb with 5 cysteines because no free cysteine in mutants with 4 cysteines is available after formation of intermolecular SS bridges. Intermolecular covalent aggregates are formed during refolding even with a mutant with only 4 cysteines but it would be likely that the amount is lower than for a mutant with 5 cysteines.

Example 11 - SEC Formulation: NLS removal by UF/DF from refolding solution to measure aggregation tendency

In order to evaluate aggregation tendency of Mycograb mutants, the NLS concentration was lowered by an average factor of 5 from the REF.End solution with ultra/diafiltration using a stir cell. The total buffer volume used during diafiltration divided by the retentate volume is the diafactor and was 2.5.

The rationale of this experiment was to investigate aggregation tendency of the mutants when the dissolving agent NLS is lowered to a concentration at which aggregation cannot be prevented anymore.

It was assumed that formation of aggregates can be assessed with SEC-HPLC formulation. The elution buffer contained 0.5M urea buffer but no NLS to suppress aggregation.

Increase in molecular weight was used as a measure of tendency to aggregate and allows the mutants to be compared.

Mutants Myc 137, Myc 106, Myc 119 and the wild type Myc 123 were selected for a first set of experiments. Table10 shows the molecular weight (MW) in kDa determined by SEC- HPLC running in formulation buffer and concentration of NLS (%) determined by RP-HPLC for REF.End samples from mutants MYC 119,137,106 and MYC 123 before and after UFDF. The NLS reduction factor was calculated from NLS concentration in the sample prior to UFDF (# 2) divided by the concentration of NLS after UFDF (#3). The % increase MW based on SEC HPLC 0,5% NLS was calculated from the MW of the REF.END sample (#1) and the MW after UFDF (#3) for the respective Mutant.

Table 10

		MYC 123		MYC 119		MYC 106 origami		MYC 137	
Sample no.	Sample code	MW [kDa]	c NLS%	MW [kDa]	c NLS %	MW [kDa]	c NLS%	MW [kDa]	c NLS %
#1	REF. END*	63.5[**]	n.d	49.3 [**]	n.d	61.5 [kDa] **	n.d	47.1 [**]	n.d
#2	Prior to UFDF	214	0.52	359	0.58	202	0.607	212	0.57
#3	After YFDF	178	0.08	245	0.171	184	0.132	194	0.114
	NLS reduction factor		6.5		3.4		4.6		5
	% increase MW based on *	180%		397%		199%		312%	

*The molecular weight was determined with an analytical SEC HPLC method containing 0.% NLS in the running buffer (SEC HPLC 0.5% NLS).

** data from Table 9.

The apparent high molecular weight determined by SEC HPLC (running with formulation buffer) of the sample prior to UFDF was due to aggregation of protein during analysis.

The sample prior to UFDF still contained 0.5% NLS. As the sample migrated through the column, NLS was more strongly retarded than the protein and consequently aggregation occurred. Therefore this analytical method was not suited to determine molecular weight of samples containing NLS.

In order to determine molecular weight of Mycograb in the REF.End sample, SEC HPLC with 0.5% NLS in the running buffer was used. The increase in MW after removal of NLS in the REF.End sample by UFDF was calculated as described above in relation to Table 10. Values are shown in row 6 of Table 10. MYC 123 showed the smallest increase in MW whereas MYC 119 had the strongest increase, 400%.

MYC 123 has a lower aggregation tendency than MYC 119 based on these data. However, it has to be considered that the analytical SEC HPLC may have an influence on the protein structure and on the formation of aggregates. Moreover, increase of MW is calculated from data obtained from two different analytical methods and it cannot be assessed if the MW of a sample is similar when it is determined with the two different methods.

In Table 11, the mutants are ranked according to increase in MW after NLS removal together with the mutations. It has to be noted that the two mutants with a 3x linker element have significantly lower % of MW increase compared with mutants with a 4x linker element.

Table 11: Increase of molecular weight after removal of NLS by UFDF for the 4 investigated mutants.

MUTANT	%molecular weight increase	HIS tag	Linker length	VH-VL alignment	cysteins
MYC 123_Wt	180	YES	3X	VH N-terminal	5
MYC 106 origami	199	YES	3X	VH N-terminal	4
MYC 137	312	NO	4X	VH N-terminal	4
MYC 119	397	NO	4X	VL N-terminal	5

Figure 21 shows an overlay of the SEC HPLC chromatograms obtained from the sample prior to UFDF and after each volume reconstitution. The shape of the elution peaks did not significantly change with reduction of NLS concentration. Consequently, the MW of the sample also remained constant with reduction of NLS. This might be an indication that there is a limit in the concentration of surfactant below which aggregation is initiated but does not proceed further. However, the impact of the analytical method on the MW of the sample is not known and may be the reason why all samples have similar MW.

The NLS concentration was reduced on average (n=5) to a concentration of 0.124% after 5 volume reconstitutions, corresponding to a diavolume of 2.5. Theoretically, for a retention R = 0 of NLS, the calculated remaining NLS concentration should be 0.020%. Equation 3 was used for calculation of the theoretical remaining NLS concentration:

$$c_{retentat} = c_{feed} \times \left(e^{(R-1)\times[\ln VCF+N]}\right) \qquad \text{equ. 3}$$

where $c_{retentat}$ is the concentration of NLS in the retentate, c_{feed} is the concentration of NLS in the feed solution. R is the retention, the fraction of solute that is retained by the membrane. VCF is the volume concentration factor and N is the diavolume which is the total buffer volume introduced to the operation during diafiltration divided by the retentate volume.

The discrepancy between the theoretical and the measured concentration of NLS in the retentate is an indication for retention of NLS by the membrane greater than 0. This might be due to interaction between NLS and the protein, membrane and/or other components. The ability to deform can also cause unwanted retention.

Example 12 - Pep-Map analysis

REF.End samples of all mutants were analyzed for disulfide bridging with peptide map. Prior to analysis, the sample was alkylated with iodoacetamide, digested with trypsin and subjected to LC-MS. UV peaks of the single peptides were identified with mass spectrometry. The peptides with free SH groups, correctly and incorrectly formed S-S

bonds as well as dimeric peptides were, whenever possible, semi-quantitatively determined.

A correctly folded construct with 5 cysteines forms an S-S bond between Cys 23 and Cys 97 which corresponds to T3 and T9 respectively. The bond T3 –T9 is located in the light chain. The other disulfide bond is on the heavy chain between Cys 159 and Cys 224, corresponding to T12 and T17. The 5th cysteine is located at Cys28 and corresponds to the T4 peptide.

A construct with 4 cysteines always lacks the Cys 28 residue, the correct S-S bridges are similar as for a construct with 5 cysteines.

Mutants 118, 119, 130, 135, 133, 134, 137 and C28Y +HIS (106) as well as C28Y-HIS (108) were analyzed in lab AL1. Mutants 106 origami, 136, 138, 139, 140 and the wild type 123 were analyzed in analytical lab AL2 with a different device. The sensitivity of the mass spectrometer in AL1 is higher than that in AL2 and therefore, a semi-quantitative analysis of mutants analyzed in AL2 could not be obtained. However, it was possible to determine if correctly formed SS bridges are present.

A summary of the obtained data is given in Table 12. The results are compiled in 3 categories: free SH, bridged cysteines and dimeric cysteines. Free cysteines indicate a SH group that did not form a disulfide bond. Bridged cysteines are intramolecular disulfide bonds and dimeric cysteines represent intermolecular disulfides. W indicates that a weak signal for the respective peptide was detected and X represents peptides giving strong signals. Mutants analyzed in AL 2 are labeled with *.

Table 12: Pep Map analysis of all tested mutants

			Mutants with 5 cysteins						Mutants with 4 cysteins							
			Myc 118	Myc119	Myc 133	Myc 134	Myc 135	Myc 123*	Myc 106* origami	Myc 130	Myc 137	Myc 138*	Myc 139*	Myc 140*	Myc 106 (C28Y + HIS)	Myc 108 (C28Y - HIS)
Free cysteins	Free SH at T4		w	w	w				no T4!							
	All other free SH		w	w	w	w	w	X								
bridged cysteins	correct disulfides															
		T3-T9	w	w	w		w			X	X				X	X
		T12-T17	X	X	X						X				X	X
	incorrect disulfides															
		all other combinations	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	w	X	X	X
Dimers	T9-T9		X		w	w				X	w				w	w
	other dimers							w								

A 'correctly 'folded Mycograb with 5 cysteines should give a significant signal for free SH at the T4 peptide and no signal corresponding to other free SH groups. Additionally, a strong signal for the correct disulfides T3-T9 and T12-T17 is expected and incorrect SS bonds should not be present. Lastly, no intermolecular SS bonds should be present.

A 'correctly 'folded Mycograb with 4 cysteines should not have any free SH groups. Only the correct S-S bonds T3-T9 and T12-T17 should be detected. Additionally, no intermolecular SS bonds should be present.

Table 12 shows that neither the wild type nor any of the mutants gave strong signals for the correct S-S bonds only. It has to be considered that the REF.End sample consists of a population of differently folded and covalently aggregated species, so that a mixture of all possible combinations of disulfide bonds and free SH groups is present. However, a promising mutant should at least show significant signals for both of the correct S-S bridges which is the case for MYC 137 and the mutants C28Y+HIS and C28Y – HIS.

In 5 cases, only incorrect S-S bonds were found, where no, or only a weak, signal was obtained for the correct disulfide bonds.

Signals for MYC 123, MYC 138, MYC 139 and MYC 140 were extremely weak and reanalysis of the samples did not yield higher signals. Though Mycograb specific peptides were found, the cysteine containing peptides gave no or only a weak signal.

This might be due to ineffective digestion of the respective portion of the protein with trypsin because of structurally blocked cleaving sites. It was also noted that mutants with increased linker length (5 and 6X instead of 3X) were more difficult to digest and consequently signals for the late eluting peptides could not or could only hardly be detected.

Interestingly, covalent disulfides were, with one exception, only formed between the two T9 peptides, corresponding to Cys 97 residues.

Mutants Myc 118, 119, 130, 133, 137 and the mutants C28Y+HIS and C28Y – HIS gave stronger signals for correct S-S bonds than the wild type. However, it has to be considered that Myc 123 was analyzed with a different mass spectrometer of lower sensitivity and hence signal intensities cannot be compared. Signals from peptides of Myc 123 can be compared with signals from mutants 106 origami, 136, 138, 139 and 140. For none of these constructs, correct disulfide bridges were obtained. Only signals for incorrect disulfides were found.

Pep Map results for Myc 137, Myc C28Y+HIS and Myc C28Y – HIS were most promising with significant signals for both correct disulfide bridges. Mutants Myc 118, Myc 119 and Myc 133 also showed a certain amount of native like disulfide bridging, however, the signal for T12-T17 was weak.

Mutant Myc 130 showed strong signals for the T12-T17 SS bond, but the second correct disulfide was not found.

Conclusions

Correlations of analytical results

The best recoveries after refolding were obtained with the MYC 123 (wt) and MYC 134, as determined by the titer assay with Poros column (RPC1).

The solubilization of IBs with chaotropic agents was faster than solubilization with NLS. RPC 2 chromatograms of IBs solubilized with urea or NLS were comparable. However, SDS Page indicated a stronger dissolving power of NLS as the aggregate smear was reduced compared with IBs solubilized with urea, see Figure 14.

Refolding after solubilization with chaotropic agents by dilution and use of different additives such as Cysteine, L-Arginine, 1% NLS and low concentration of urea/ GuHCl did not show a monomeric peak in RPC 2, see Figure 12 and Figure 13. The protein completely aggregated which was confirmed by SDS Page, non reducing and the RPC 2 chromatogram showed a huge peak 2.

The determination of MW with SEC HPLC 0.5% NLS correlated with an R^2 of 0.77 with the theoretically calculated MW when 1 outlier was excluded. The resolving power of SDS PAGE was not sufficient to detect all subtle differences in MW, but a migration time difference was seen between two mutants of a MW differing by 0.6kDa in theory and 14kDa as measured with SEC HPLC (MYC 134 and MYC 118, respectively).

RPC 2 chromatography was able to confirm decreased hydrophobicity of a mutant where 10 hydrophobic amino acids were replaced by more hydrophilic ones (MYC 130). The linker element did not have easy access to binding sites of the stationary phase and did not therefore have influence on retention behavior. It was also observed that Pep Map analysis for constructs with increased linker length gave weaker signals for the peptides of interest compared with constructs with shorter linker. It appeared that the linker element was not easily accessible for the digesting enzyme.

RPC2 chromatograms for MYC 137,138 and 139 showed the sharpest peak which is attributed to a Mycograb Monomer compared with the other tested mutants, indicating increased homogeneity of the sample.

Pep Map analysis showed that almost no free SH group was present in REF.End samples for mutants with 4 Cysteines. This indicates an almost complete formation of disulfide bridges (incorrect and correct ones) as well as formation of covalent aggregates. For mutants with 5 cysteines, weak signals were obtained for various free

SH groups but only mutants Myc 118, Myc 119 and Myc 133 had a free SH group at T4, the location of the 5th cysteine which should remain reduced in the 'native' monomer. This is an indication that the SH group on the T4 peptide preferably forms SS bonds because all mutants with 5 cysteines gave signals for free SH groups but only in 3 of them a free SH group at T4 was detected.

MW determined with SEC HPLC is very dependent on the buffer matrix in the sample. A couple of SEC HPLC methods had to be established with a running buffer similar to the buffer of the sample. The matrix dependency of MW determination makes comparison of MW across process steps difficult (Table 10).

The UFDF experiment showed that NLS is to some extent retained in the sample solution and cannot efficiently be removed.

The results obtained with Pep Map of Mutants MYC C28Y +HIS, C28Y-HIS and MYC 137 were particularly promising. The results indicate that a mutant with a HIS tag and only 4 cysteines is particularly preferred. The HIS tag is required for purification with IMAC, a purification step of high efficiency. A construct with only 4 cysteines is more likely to form correct disulfides and fewer covalent aggregates.

Effects of mutations

The most beneficial effect of the mutations can be attributed to the removal of the 5th cysteine. The number of correct disulfide bonds was increased compared with constructs with 5 cysteines. Additionally, solubility of the IBs was enhanced compared with constructs with 5 cysteines.

Exchanging the orientation of the heavy and light chain fragment had a minor effect on retention time in RPC 2 where the retention time decreased when the VL element was C terminal compared with an N-terminal orientation.

The tendency of the peptides to aggregate after NLS removal may be increased with the number of linker elements.

CLAIMS:

1. An scFv peptide comprising a V_H domain and a V_L domain linked by an amino acid spacer, wherein the V_H domain comprises a sequence with at least 80% sequence identity to the sequence of SEQ ID NO. 64 and the V_L domain comprises a sequence with at least 80% sequence identity to the sequence of SEQ ID NO. 66 and wherein the scFv peptide comprises the substitution or deletion of an amino acid in the V_H domain at the position corresponding to C_{28}.

2. An scFv peptide according to claim 1 wherein the substitution of the amino acid in the V_H domain is $C_{28}Y$.

3. An scFv peptide according to claim 1 or 2 wherein the amino acid spacer comprises the sequence $(GGGGS)_n$.

4. An scFv peptide according to any one of the preceding claims further comprising a purification tag, preferably a sequence of 6 histidine residues at the C-terminus.

5. An scFv peptide according to any one of the preceding claims comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO. 8, 10, 14, 18 and 22 wherein Xaa denotes an amino acid residue other than cysteine and wherein the N-terminal methionine residue may optionally be cleaved off, preferably wherein Xaa denotes a tyrosine residue.

6. A nucleic acid molecule comprising a sequence encoding an scFv peptide according to any one of the preceding claims.

7. A nucleic acid molecule according to claim 6 further comprising the sequence $(taa)_n$ located at the 3' end of the sequence encoding the scFv peptide wherein n is 1 or 2.

8. A nucleic acid molecule according to claim 6 or 7 wherein the molecule comprises a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO. 7, 9, 13, 17 and 21 wherein nnn denotes a codon coding for an amino acid other than a cysteine residue.

9. A nucleic acid molecule according to any one of claims 6 to 8 wherein the molecule is a DNA or RNA molecule.

10. A pharmaceutical composition comprising an scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 in combination with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier.

11. A combined preparation comprising an scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 and an antifungal agent or an anticancer agent.

12. A composition comprising an scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 and an antifungal agent or an anticancer agent.

13. A method of treating a patient with a fungal infection comprising administering to the patient an effective amount of an scFv peptide according to any one of claims 1 to 5.

14. A method according to claim 13 further comprising the step of administering to the patient an effective amount of an antifungal agent.

15. An scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 for use in the treatment of a fungal infection.

16. The method according to claim 14 or 15 or the scFv peptide according to claim 15 wherein the fungal infection is due to a Candida, Cryptococcus, Histoplasma, Aspergillus, Torulopsis, Mucormycosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis or Paracoccidioidomycosis organism.

17. The combined preparation according to claim 11, the composition according to claim 12, the method according to claim 13, 14 or 16 or the scFv peptide according to claim 15 or 16 wherein the antifungal agent is an azole antifungal, preferably selected from the group consisting of: itraconazole, voriconazole isavuconazole, fluconazole, miconazole, ketoconazole, and posaconazole.

18. The combined preparation according to claim 11, the composition according to claim 12, the method according to claim 13, 14 or 16 or the scFv peptide according to claim 14 or 16 wherein the antifungal agent is selected from the group consisting of: a polyene antifungal agent and an echinocandin antifungal agent.

19. The combined preparation, composition, method or scFv peptide according to claim 18 wherein the polyene antifungal agent comprises amphotericin B or a derivative thereof.

20. A method of treating a patient with a cancer disease comprising administering to the patient in need an effective amount of a scFv peptide according to any one of claims 1 to 5.

21. A method according to claim 20 further comprising the step of administering to the patient an effective amount of at least one other anticancer agent.

22. An scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 for use in the treatment of a cancer disease.

23. The combined preparation according to claim 11, the composition according to claim 12, the method according to claim 20 or 21 or the scFv peptide according to claim 22 wherein the anticancer agent is selected from the group consisting of: Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Herceptin, Docetaxel, Cisplatin, Imatinib, Paclitaxel, Docetaxel, Hydroxyurea, 5-fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan, Cytarabine and Raltitrexed.

24. A method of treating a patient with of a condition involving raised levels of TNFα and/or IL-6 comprising administering to the patient an effective amount of a scFv peptide according to any one of claims 1 to 5.

25. An scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 for use in the treatment of a condition involving raised levels of TNFα and/or IL-6.

26. A method according to claim 24 or an scFv peptide according to claim 25 wherein the condition involving raised levels of TNFα and/or IL-6 is selected from the group consisting of: sepsis, SIRS and an autoimmune disease.

27. A method or scFv peptide according to claim 26 wherein the autoimmune disease is selected from the group consisting of: Crohn's disease, rheumatoid arthritis, ulcerative colitis and systemic lupus erythematosus.

28. A vector molecule comprising a nucleotide sequence according to any one of claims 6 to 9.

29. A host cell comprising a vector molecule according to claim 28.

30. A method for producing a scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 which comprises culturing a host cell having incorporated therein an expression vector containing, under control of suitable transcriptional control elements, a nucleic acid molecule according to any one of claims 6 to 9 under conditions sufficient for expression of said peptides in the host cell thereby causing the production of said peptide and recovering the peptide produced by said cell.

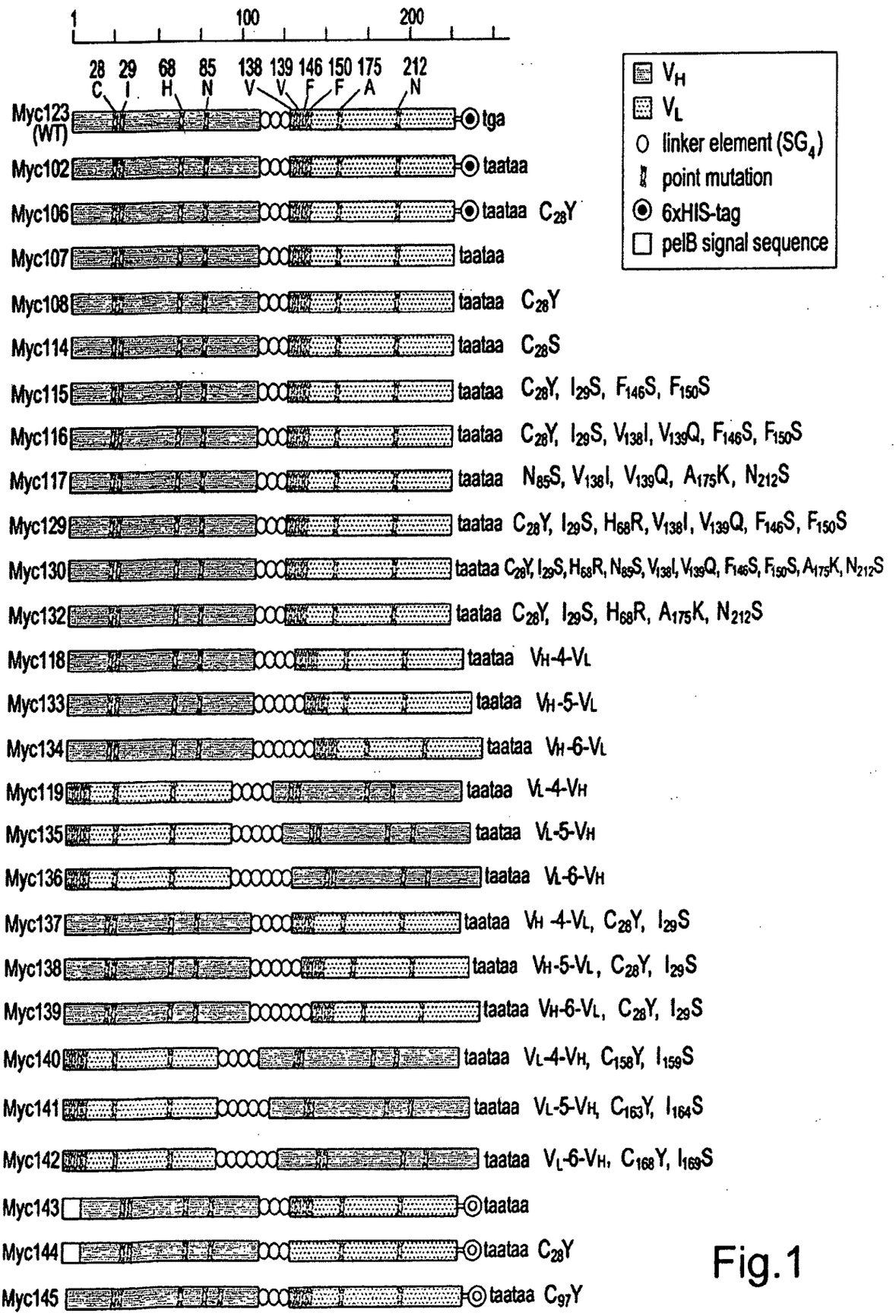

1
100
200
28 29 68 85 138 139 146 150 175 212
C I H N V V F F A N
Myc123 (WT) tga
Myc102 taataa
Myc106 taataa C28Y
Myc107 taataa
Myc108 taataa C28Y
Myc114 taataa C28S
Myc115 taataa C28Y, I29S, F146S, F150S
Myc116 taataa C28Y, I29S, V138I, V139Q, F146S, F150S
Myc117 taataa N85S, V138I, V139Q, A175K, N212S
Myc129 taataa C28Y, I29S, H68R, V138I, V139Q, F146S, F150S
Myc130 taataa C28Y, I29S, H68R, N85S, V138I, V139Q, F146S, F150S, A175K, N212S
Myc132 taataa C28Y, I29S, H68R, A175K, N212S
Myc118 taataa VH-4-VL
Myc133 taataa VH-5-VL
Myc134 taataa VH-6-VL
Myc119 taataa VL-4-VH
Myc135 taataa VL-5-VH
Myc136 taataa VL-6-VH
Myc137 taataa VH -4-VL, C28Y, I29S
Myc138 taataa VH-5-VL, C28Y, I29S
Myc139 taataa VH-6-VL, C28Y, I29S
Myc140 taataa VL-4-VH, C158Y, I159S
Myc141 taataa VL-5-VH, C163Y, I164S
Myc142 taataa VL-6-VH, C168Y, I169S
Myc143 taataa
Myc144 taataa C28Y
Myc145 taataa C97Y
VH
VL
linker element (SG4)
point mutation
6xHIS-tag
pelB signal sequence

Fig.1

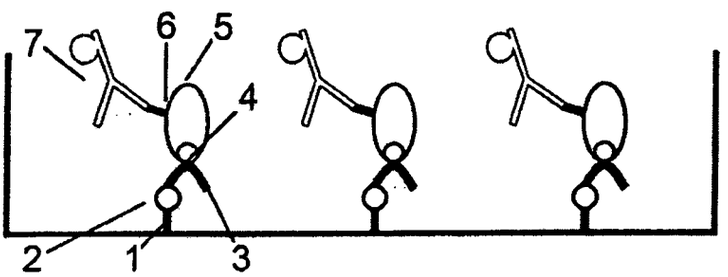

7
6
5
4
2
1
3

Fig. 2

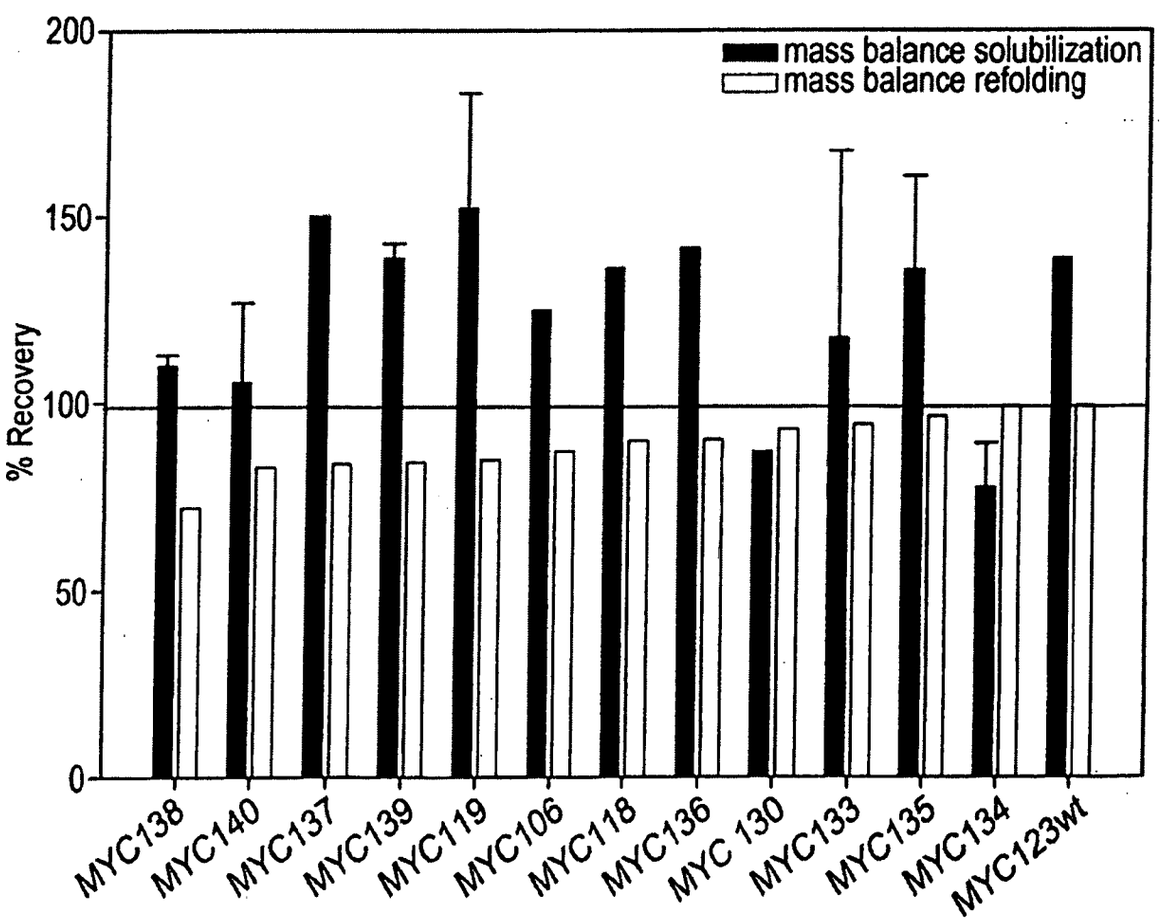

mass balance solubilization
mass balance refolding
% Recovery
200
150
100
50
0
MYC138
MYC140
MYC137
MYC139
MYC119
MYC106
MYC118
MYC136
MYC 130
MYC133
MYC135
MYC134
MYC123wt

Fig. 3

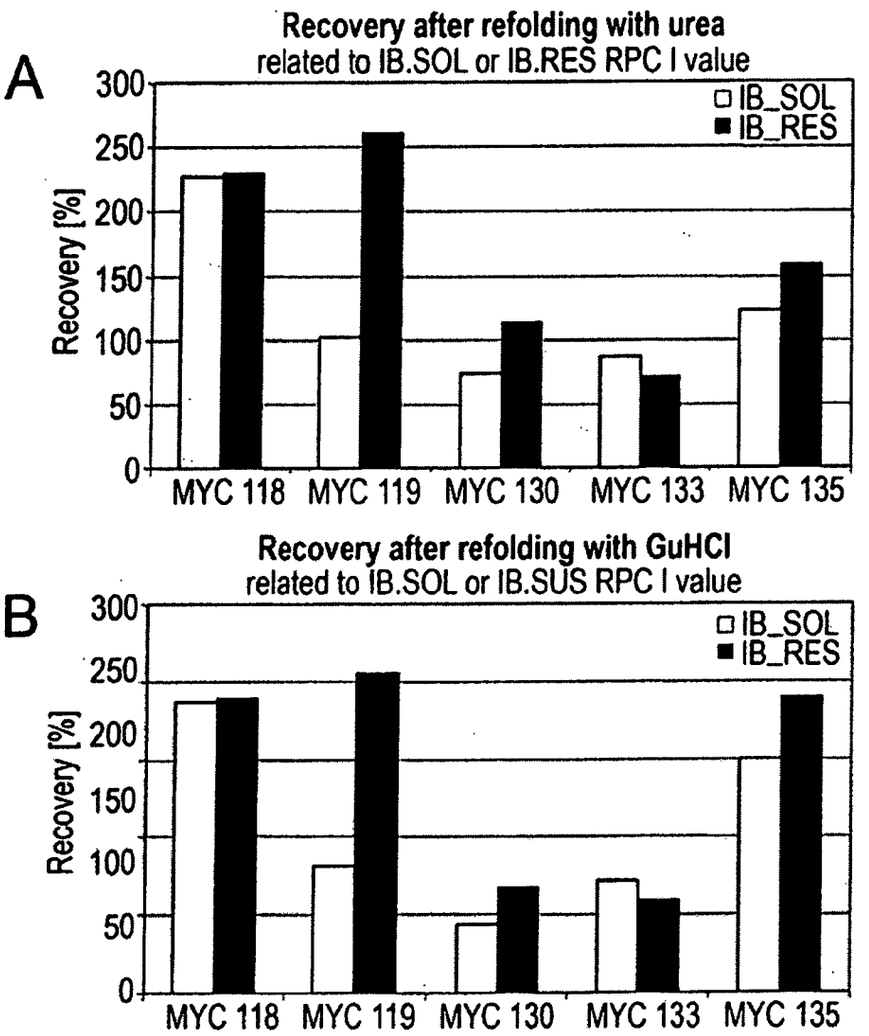

A
Recovery after refolding with urea
related to IB.SOL or IB.RES RPC I value
Recovery [%]
300
250
200
150
100
50
0
IB_SOL
IB_RES
MYC 118
MYC 119
MYC 130
MYC 133
MYC 135
B
Recovery after refolding with GuHCl
related to IB.SOL or IB.SUS RPC I value
Recovery [%]
300
250
200
150
100
50
0
IB_SOL
IB_RES
MYC 118
MYC 119
MYC 130
MYC 133
MYC 135

Fig. 4

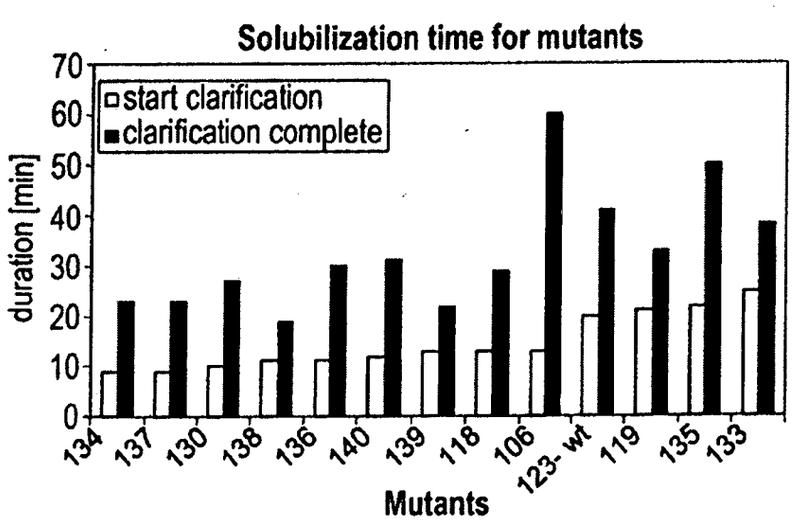

Solubilization time for mutants
duration [min]
70
60
50
40
30
20
10
0
start clarification
clarification complete
134
137
130
138
136
140
139
118
106
123- wt
119
135
133
Mutants

Fig. 5

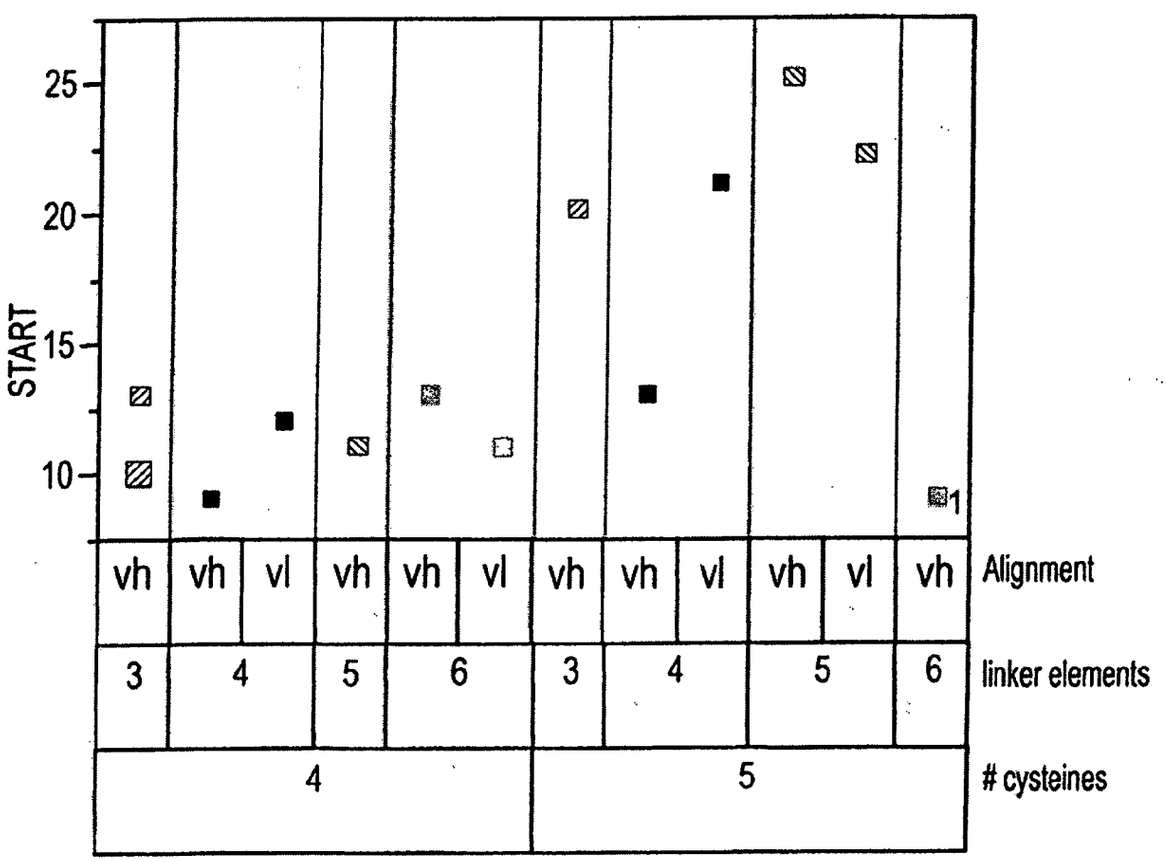

START
25
20
15
10
1
vh vh vl vh vh vl vh vh vl vh vl vh
Alignment
3 4 5 6 3 4 5 6
linker elements
4 5
cysteines

Fig. 6

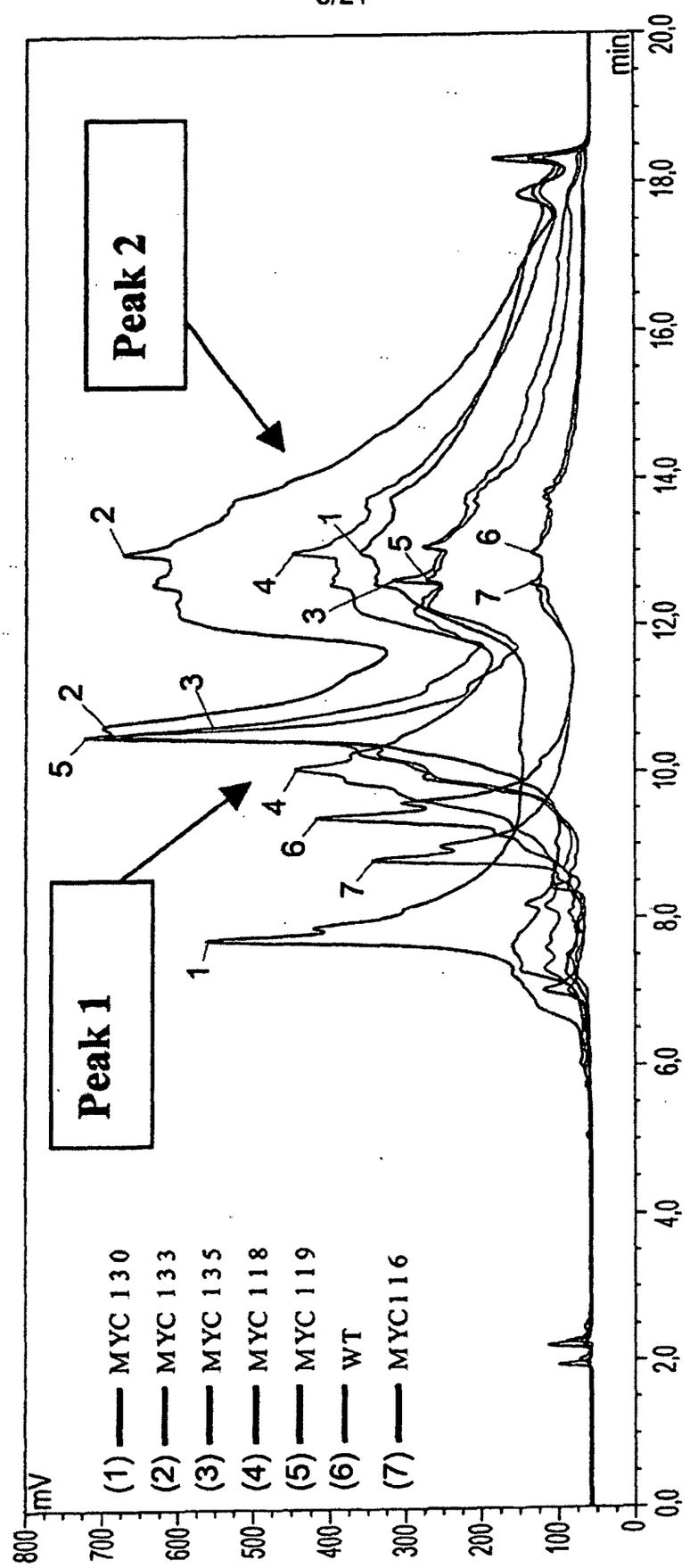

Peak 1
Peak 2
mV
min
(1) MYC 130
(2) MYC 133
(3) MYC 135
(4) MYC 118
(5) MYC 119
(6) WT
(7) MYC116
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0,0
2,0
4,0
6,0
8,0
10,0
12,0
14,0
16,0
18,0
20,0

Fig. 7

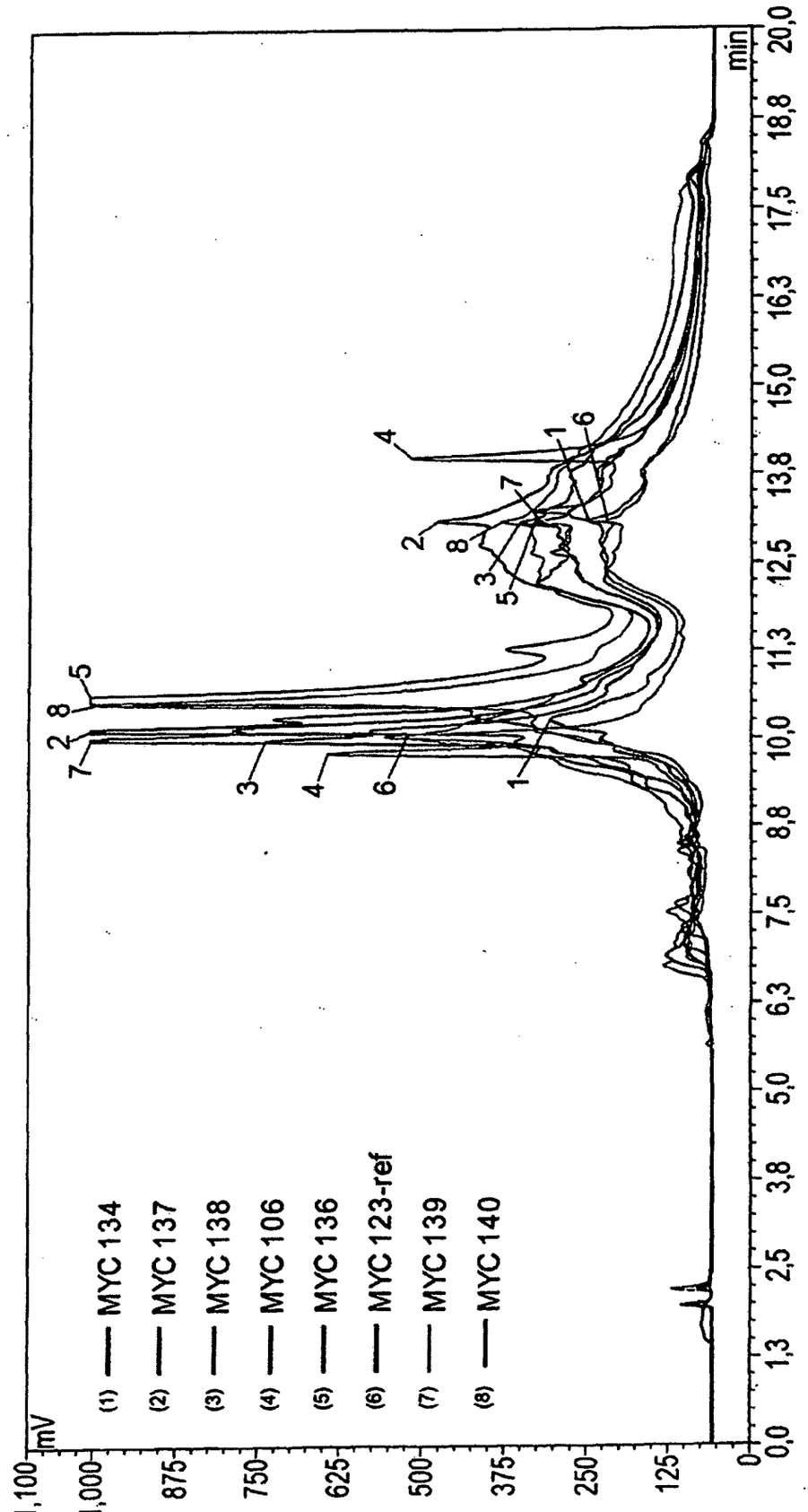

mV
1,100
1,000
875
750
625
500
375
250
125
0
min
0,0
1,3
2,5
3,8
5,0
6,3
7,5
8,8
10,0
11,3
12,5
13,8
15,0
16,3
17,5
18,8
20,0
(1) MYC 134
(2) MYC 137
(3) MYC 138
(4) MYC 106
(5) MYC 136
(6) MYC 123-ref
(7) MYC 139
(8) MYC 140

Fig. 8

Scaled Estimates

Nominal factors expanded to all levels
Continuous factors centred by mean, scaled by range/2

Term	Scaled Estimate	Std Error	t Ratio	Prob>|t|
Intercept	10,339265	0,055599	185,96	<,0001*
linker length	0,1344474	0,076476	1,76	0,1168
cysteines	0,0928026	0,052553	1,77	0,1154
arrangement[VH]	-0,209796	0,055923	-3,75	0,0056*
arrangement[VL]	0,2097961	0,055923	3,75	0,0056*

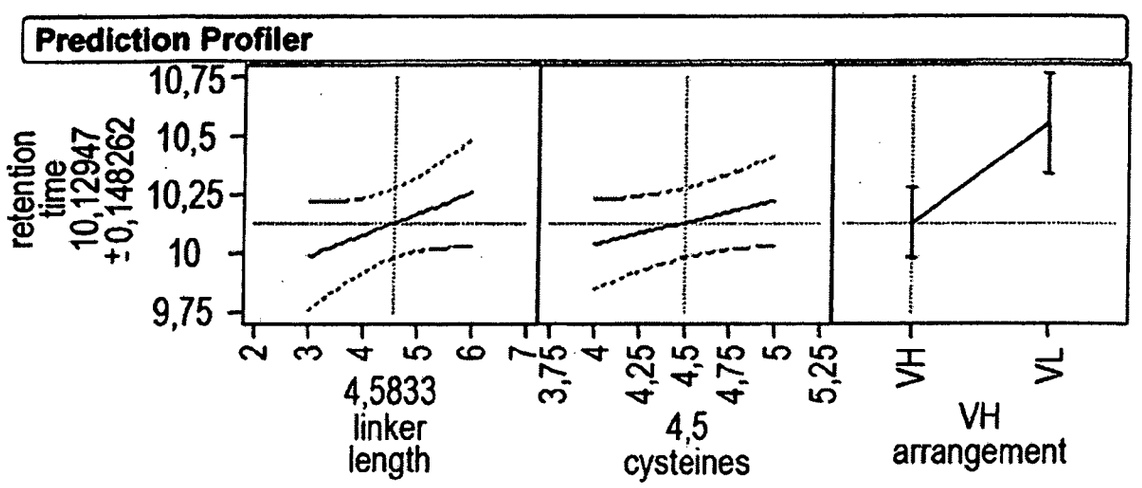


Fig. 9

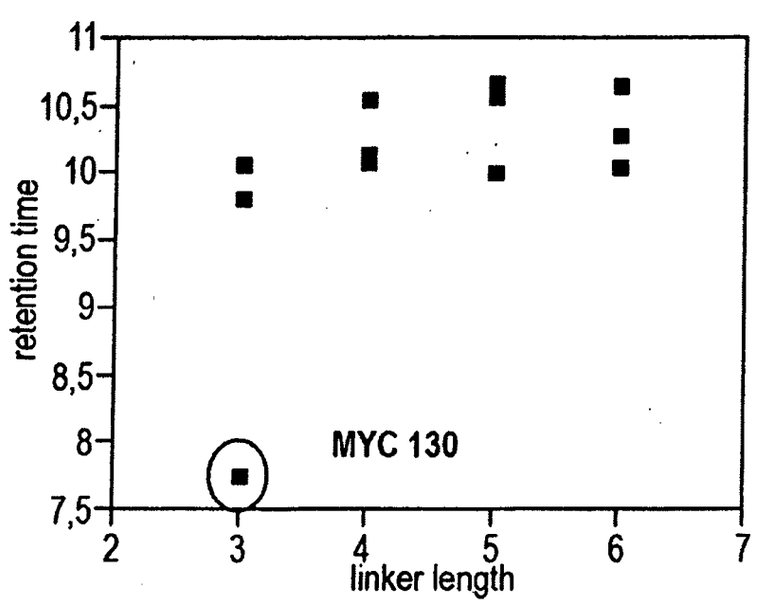
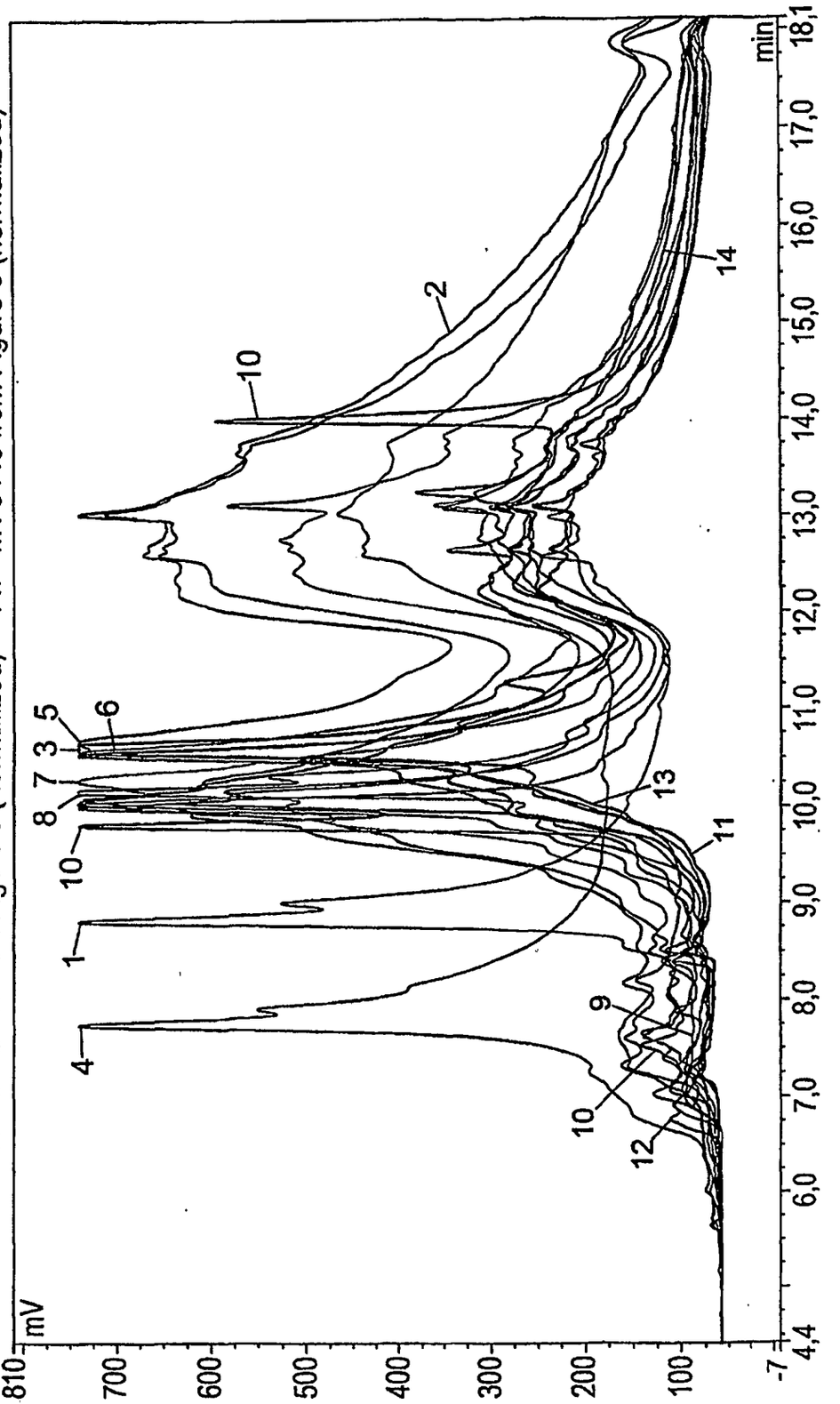


Fig. 10

Fig.11

1. MYC116 from Figure 7 (normalized)
2. MYC118 from Figure 7 (normalized)
3. MYC119 from Figure 7 (normalized)
4. MYC130 from Figure 7 (normalized)
5. MYC133 from Figure 7 (normalized)
6. MYC135 from Figure 7 (normalized)
7. MYC134 from Figure 8 (normalized)
8. MYC137 from Figure 8 (normalized)
9. MYC138 from Figure 8 (normalized)
10. MYC106 from Figure 8 (normalized)
11. MYC136 from Figure 8 (normalized)
12. MYC139 from Figure 8 (normalized)
13. MYC123-ref from Figure 8 (normalized)
14. MYC140 from Figure 8 (normalized)



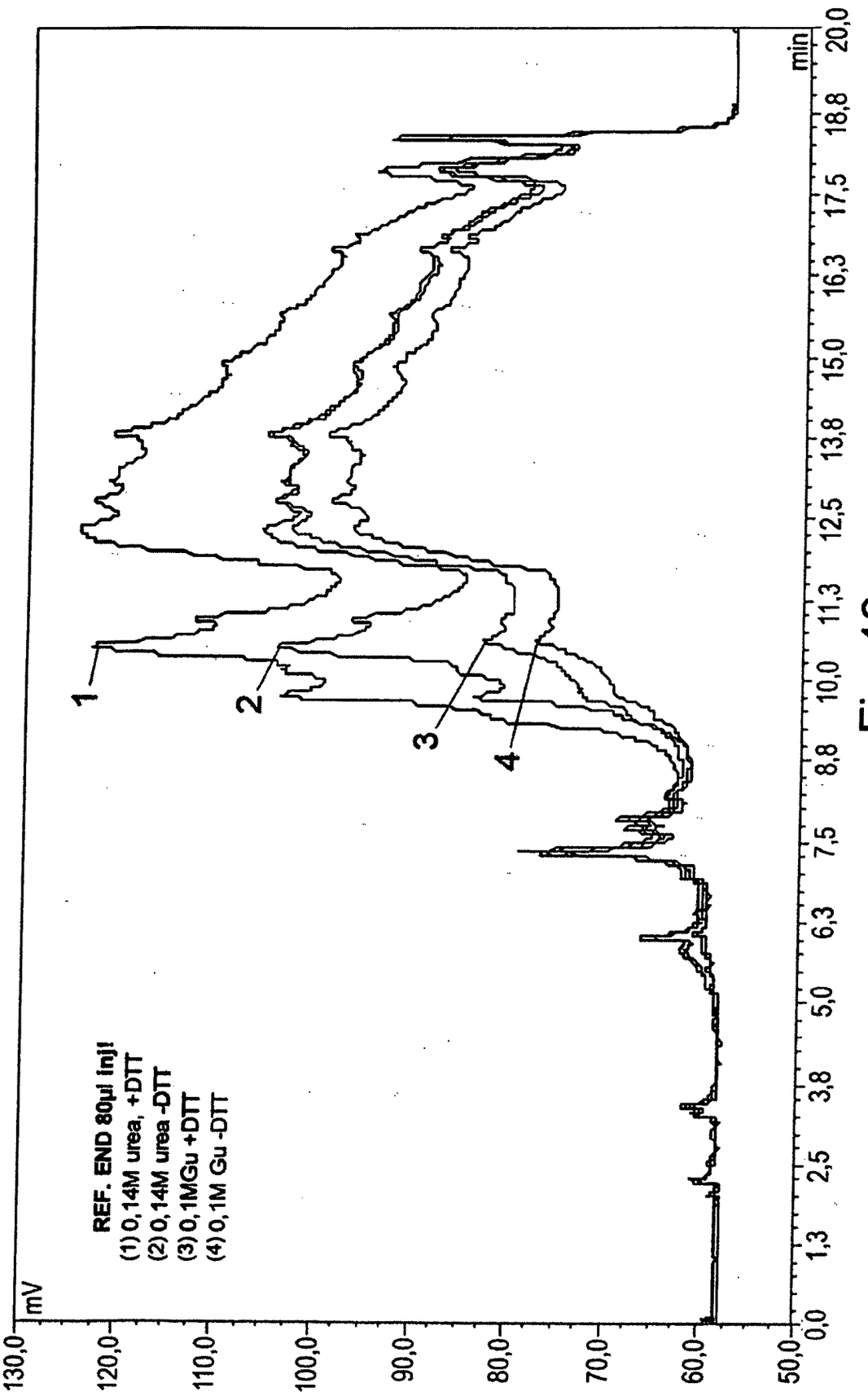

REF. END 80µl Inj!
(1) 0,14M urea, +DTT
(2) 0,14M urea -DTT
(3) 0,1MGu +DTT
(4) 0,1M Gu -DTT
mV
min
130,0
120,0
110,0
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
0,0
1,3
2,5
3,8
5,0
6,3
7,5
8,8
10,0
11,3
12,5
13,8
15,0
16,3
17,5
18,8
20,0
1
2
3
4

Fig. 12

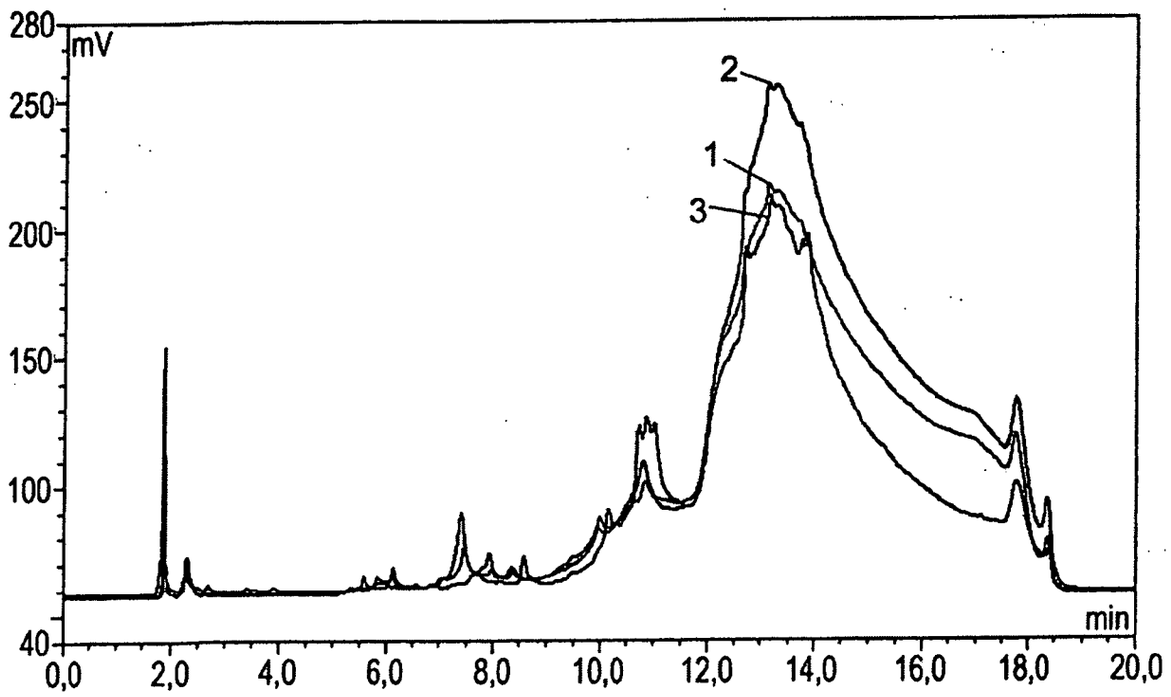
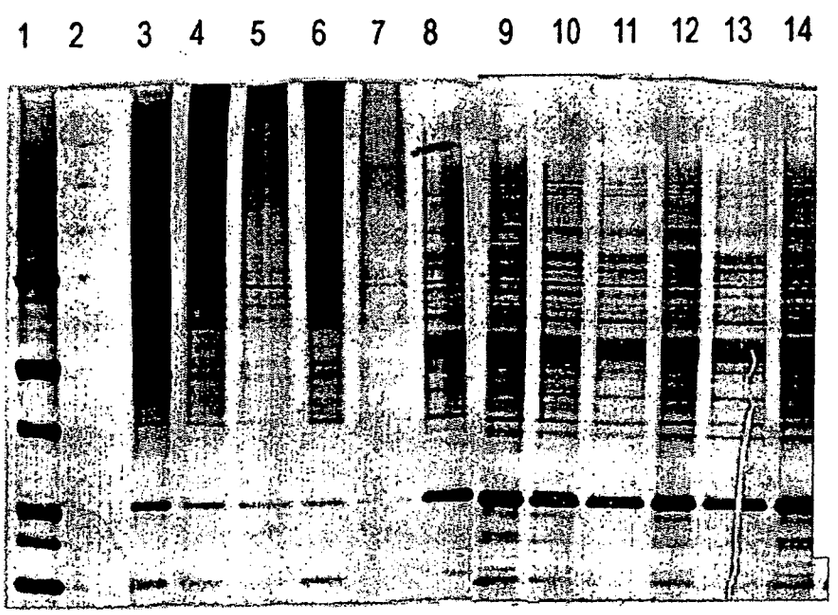


Fig. 13



1: MWM Protein plus
3: IB_SOL w urea, n-r
4: REF_IM w urea, n-r 1:10
5: REF_IM w urea, n-r 1:50
6:REF_END w urea, n-r 1:10
7: REF_END w urea, n-r 1:50
8: IB_SOL w NLS, n-r
9: IB_SOL w urea, r
10: REF_IM w urea, r 1:10
11: REF_IM w urea, r 1:50
12:REF_END w urea, r 1:10
13: REF_END w urea, r 1:50
14: IB_SOL w NLS, r

Fig. 14

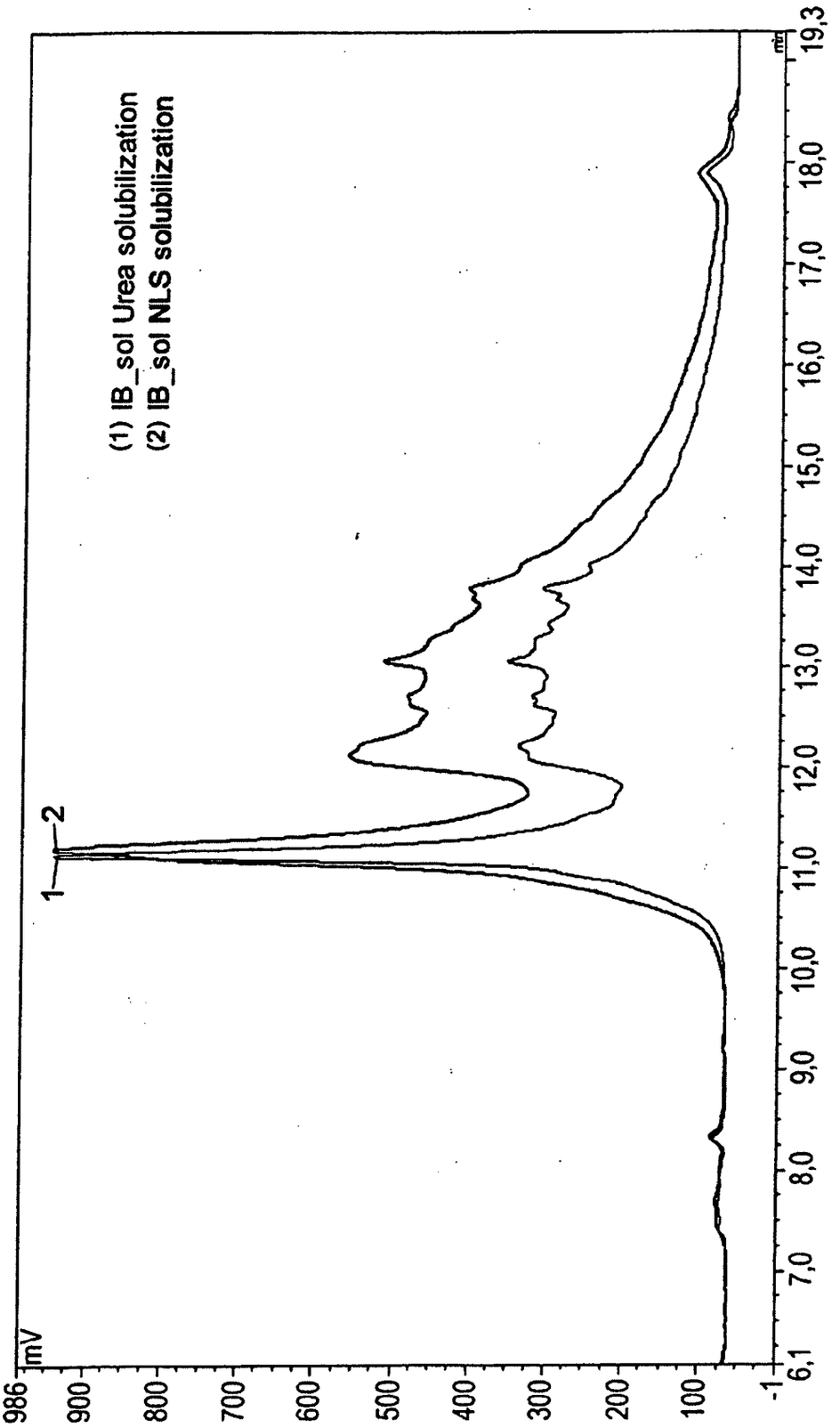
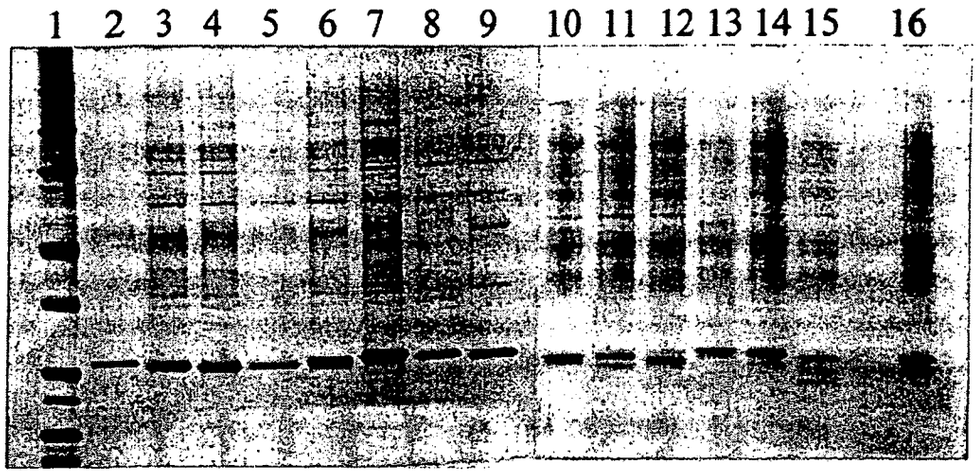
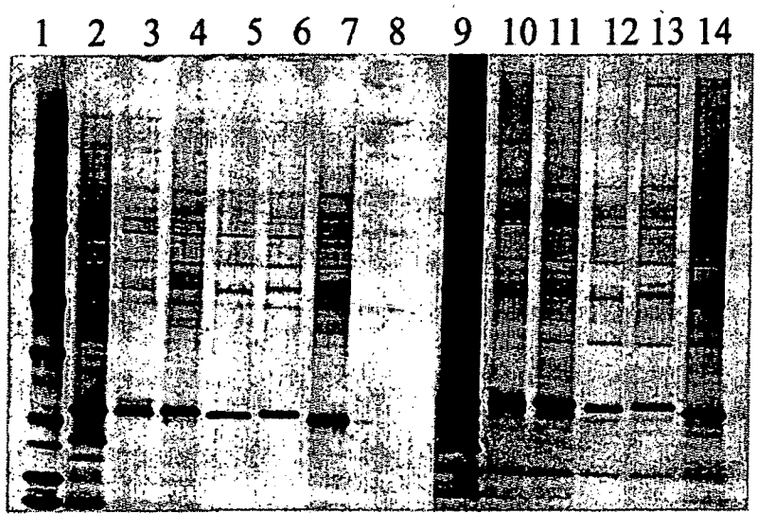

(1) IB_sol Urea solubilization
(2) IB_sol NLS solubilization
mV
986
900
800
700
600
500
400
300
200
100
-1
6,1
7,0
8,0
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,3
1
2

Fig. 15



1: MWM Protein$_{plus}$ 2: Reference Biomeva
3: MYC 118, r 10: MYC 118,n-r
4: MYC 119; r 11: MYC 119 n-r
5: MYC 130; r 12: MYC 133 n-r
6: MYC 133; r 13: MYC 134 n-r
7: MYC 134; r 14: MYC 135 n-r
8: MYC 135; r 15: MYC 137 n-r
9: MYC 137, r 16: MYC 130 n-r

Fig. 16



1: MWM Protein plus
2: MYC 106,$_{origami}$ r9: MYC 106,n-r
3: MYC 123; r10: MYC 123n-r
4: MYC 136; r11: MYC 136 n-r
5: MYC 138; r12: MYC 138 n-r
6: MYC 139; r13: MYC 139 n-r
7: MYC 140; r14: MYC 140 n-r

Fig. 17

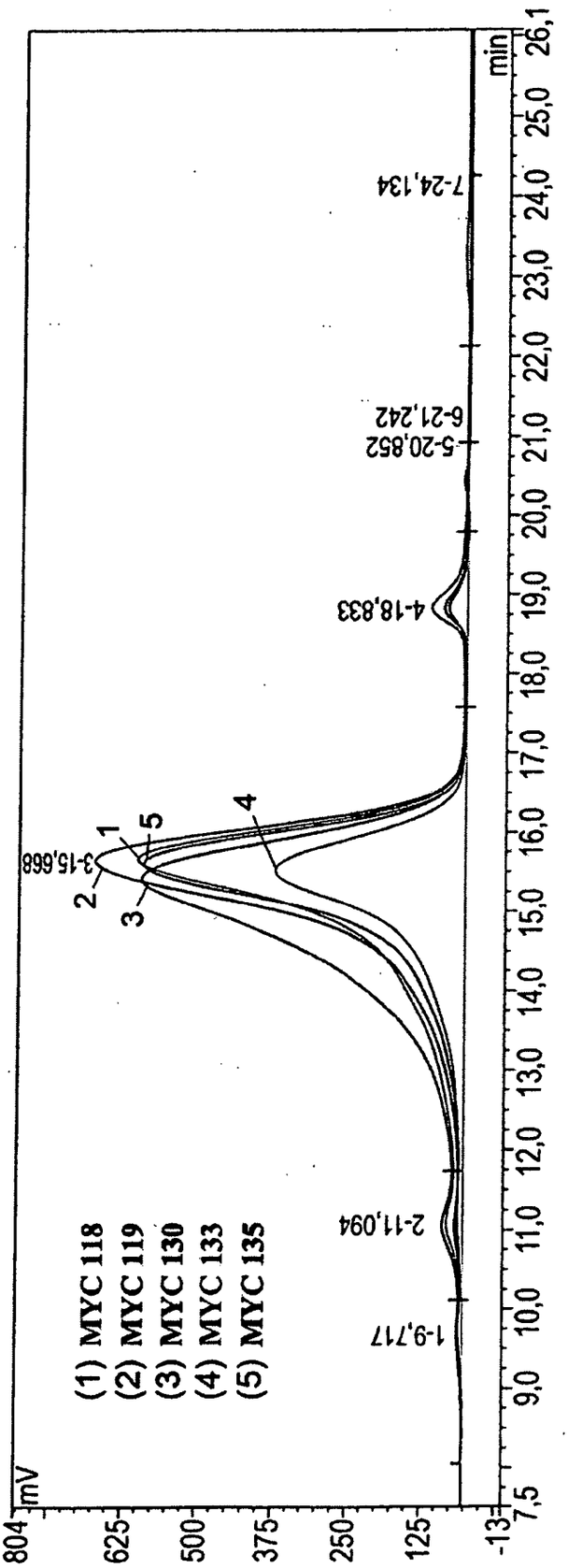

mV
804
625
500
375
250
125
-13
min
7,5
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,1
(1) MYC 118
(2) MYC 119
(3) MYC 130
(4) MYC 133
(5) MYC 135
1-9,717
2-11,094
3-15,668
4-18,833
5-20,852
6-21,242
7-24,134

Fig. 18

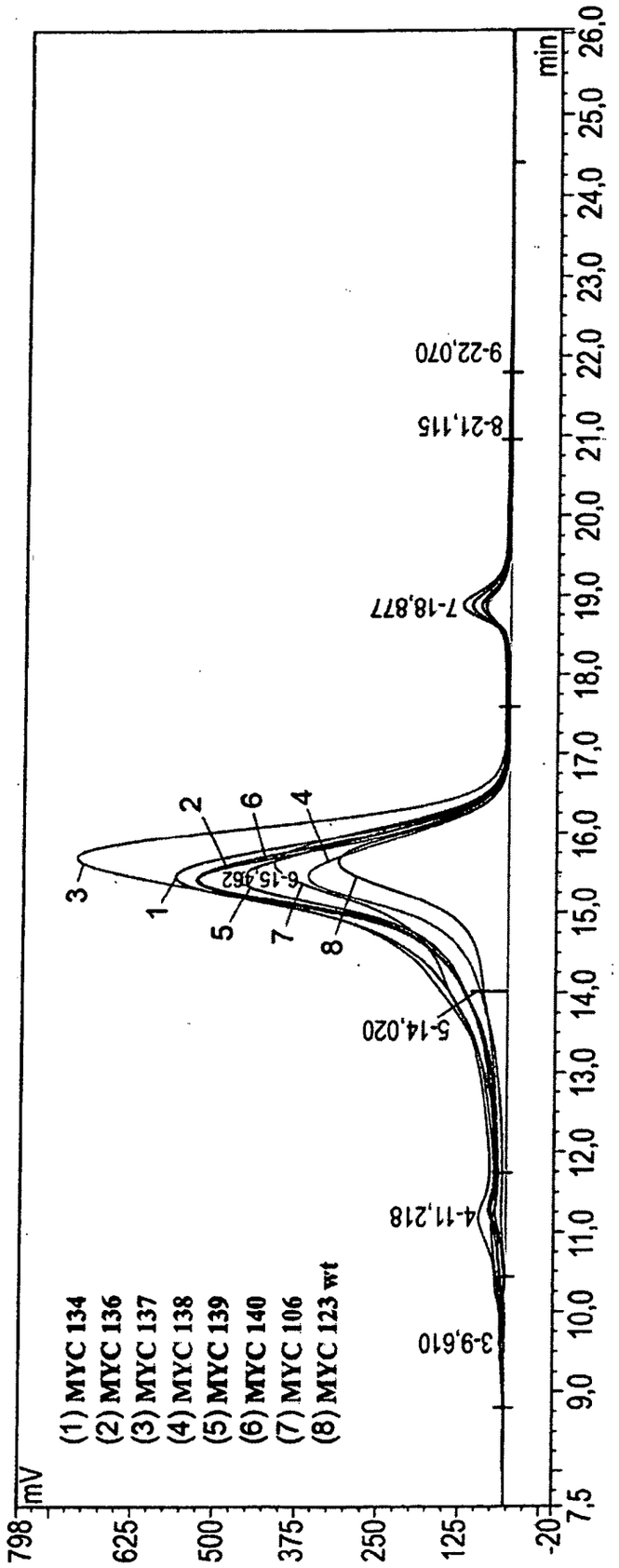

mV
798
625
500
375
250
125
-20
min
7,5
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,0
(1) MYC 134
(2) MYC 136
(3) MYC 137
(4) MYC 138
(5) MYC 139
(6) MYC 140
(7) MYC 106
(8) MYC 123 wt
3-9,610
4-11,218
5-14,020
6-15,362
7-18,877
8-21,115
9-22,070

Fig. 19

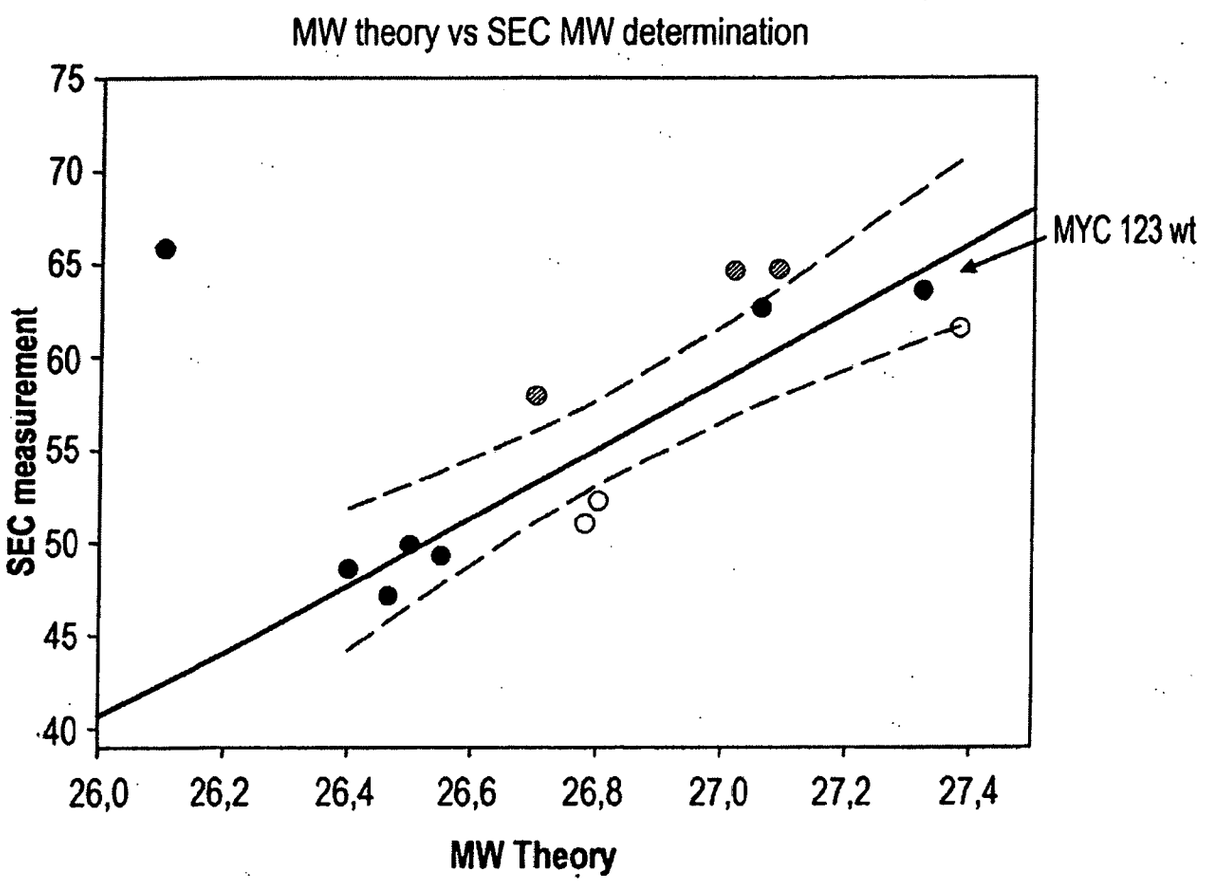
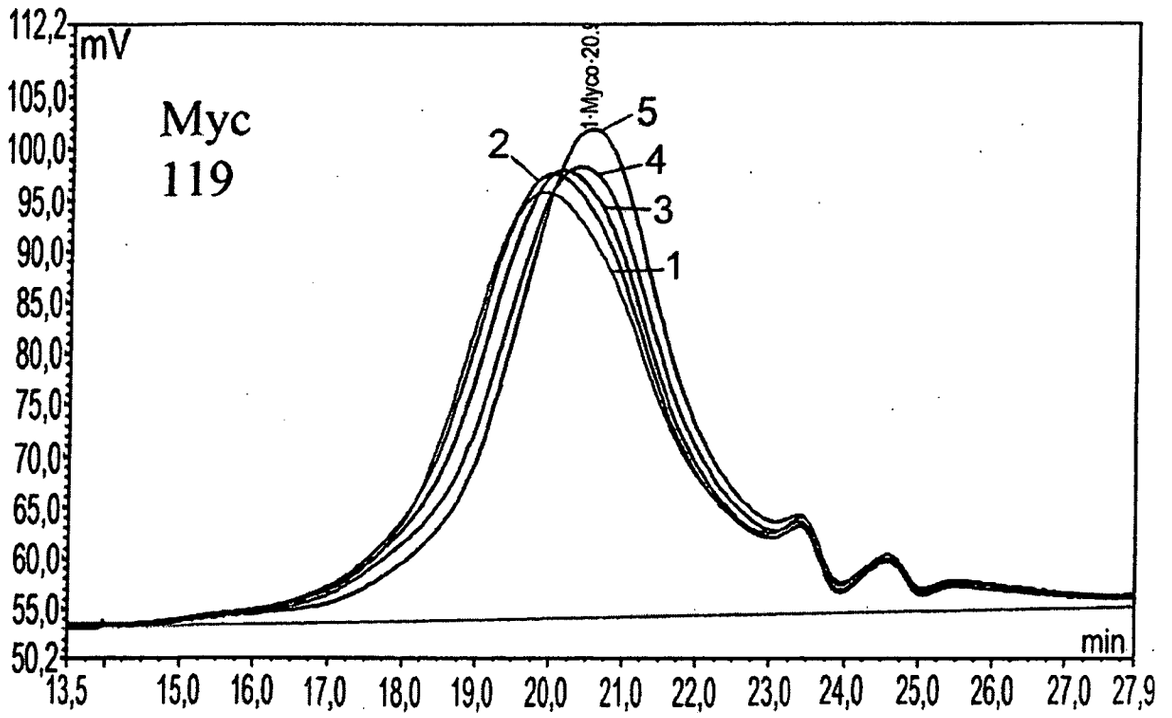

MW theory vs SEC MW determination
SEC measurement
MW Theory
MYC 123 wt
75
70
65
60
55
50
45
40
26,0
26,2
26,4
26,6
26,8
27,0
27,2
27,4

Fig. 20


112,2
mV
105,0
100,0
95,0
90,0
85,0
80,0
75,0
70,0
65,0
60,0
55,0
50,2
Myc
119
1-Myco-20.9
5
4
3
2
1
min
13,5
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,0
27,0
27,9

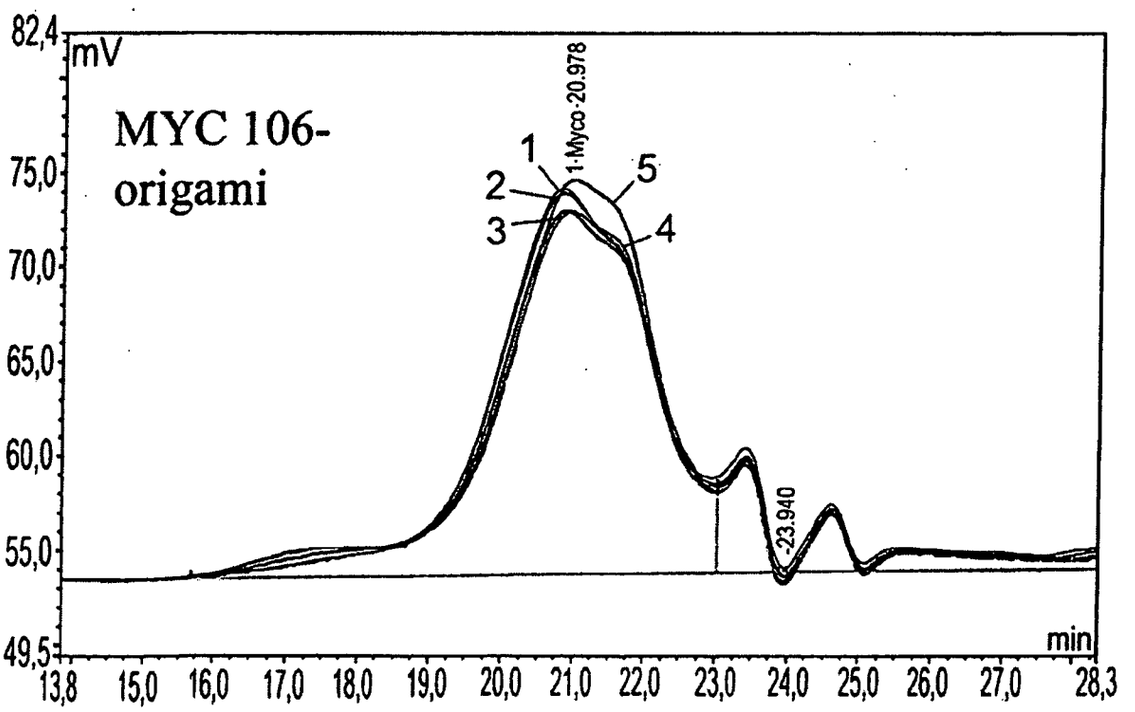
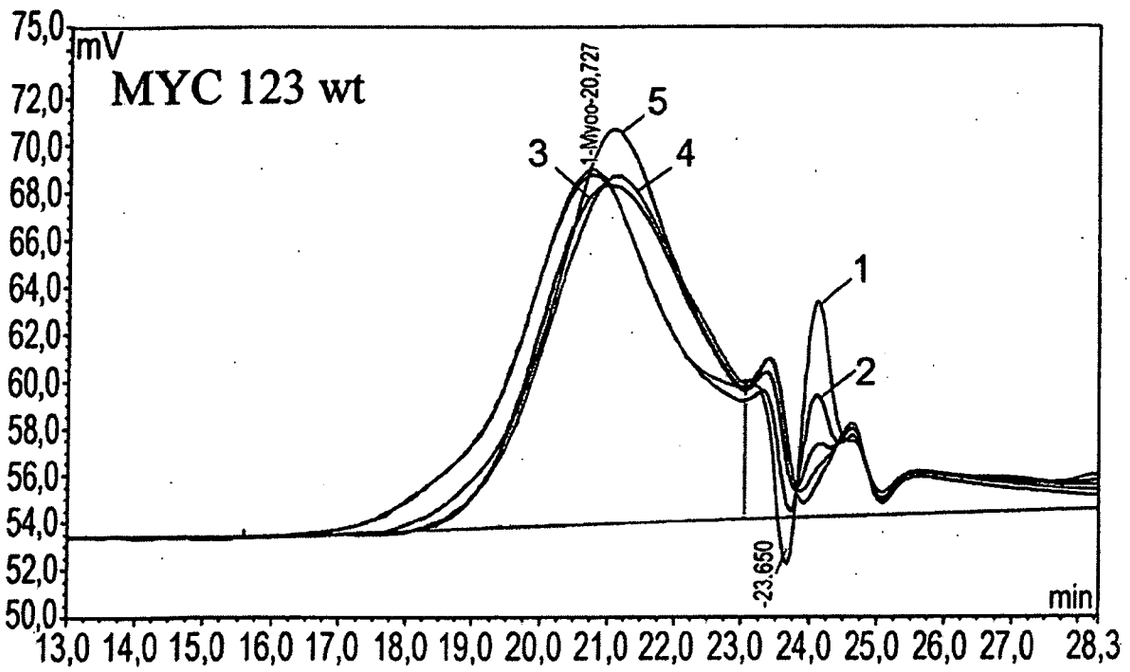

82,4
mV
75,0
70,0
65,0
60,0
55,0
49,5
MYC 106-
origami
1-Myco-20.978
1
2
3
5
4
23.940
min
13,8
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,0
27,0
28,3

Fig. 21



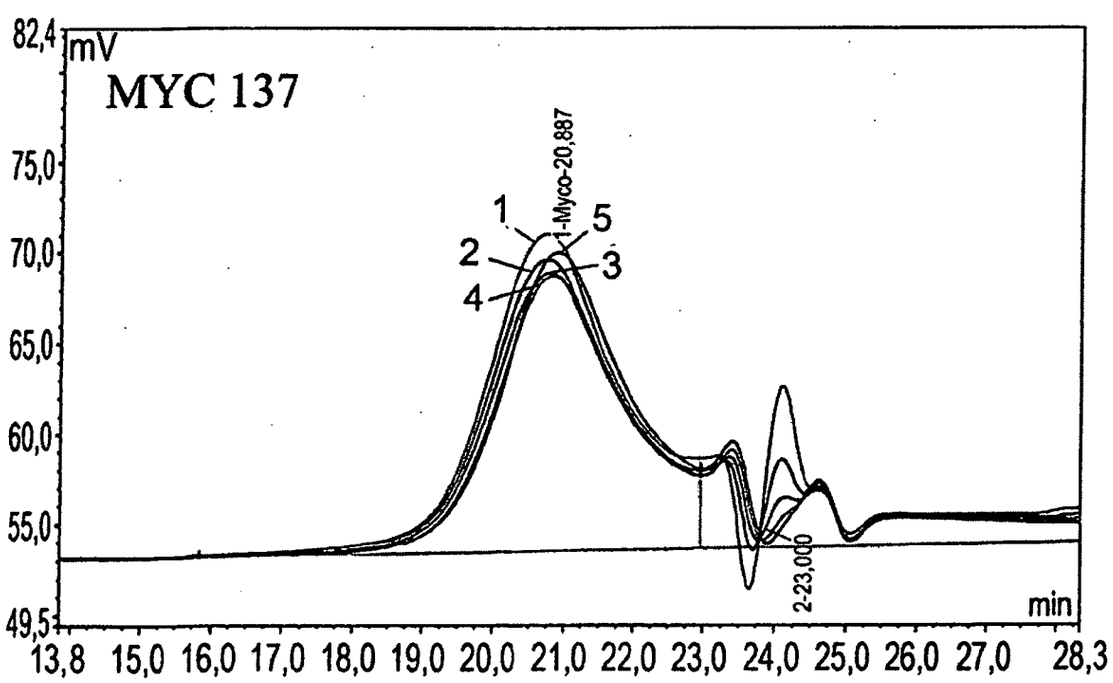


Fig. 21 (continued)

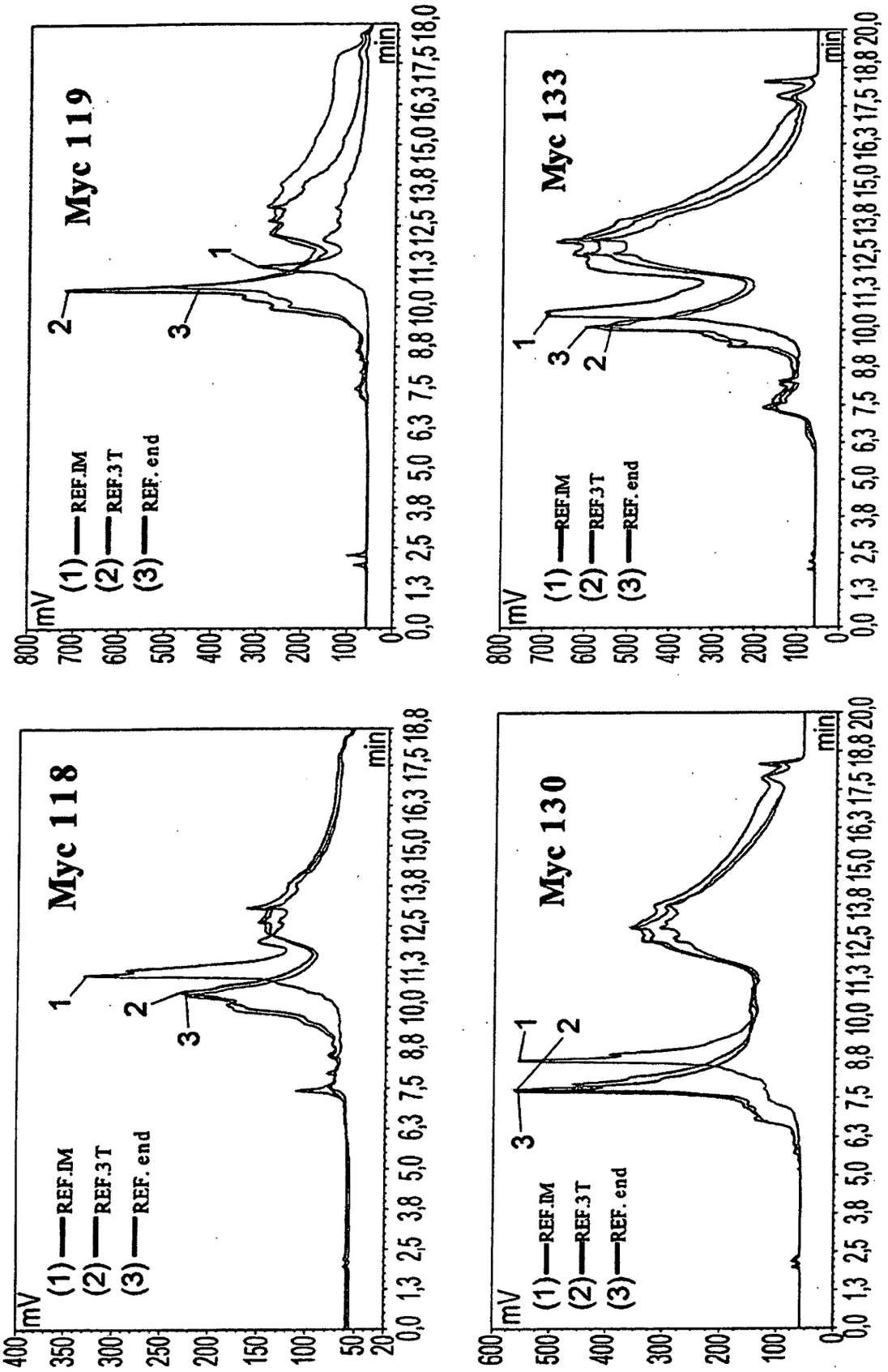

Myc 119
Myc 133
Myc 118
Myc 130
mV
min
(1) REF.IM
(2) REF.3T
(3) REF. end
1
2
3

Fig. 22

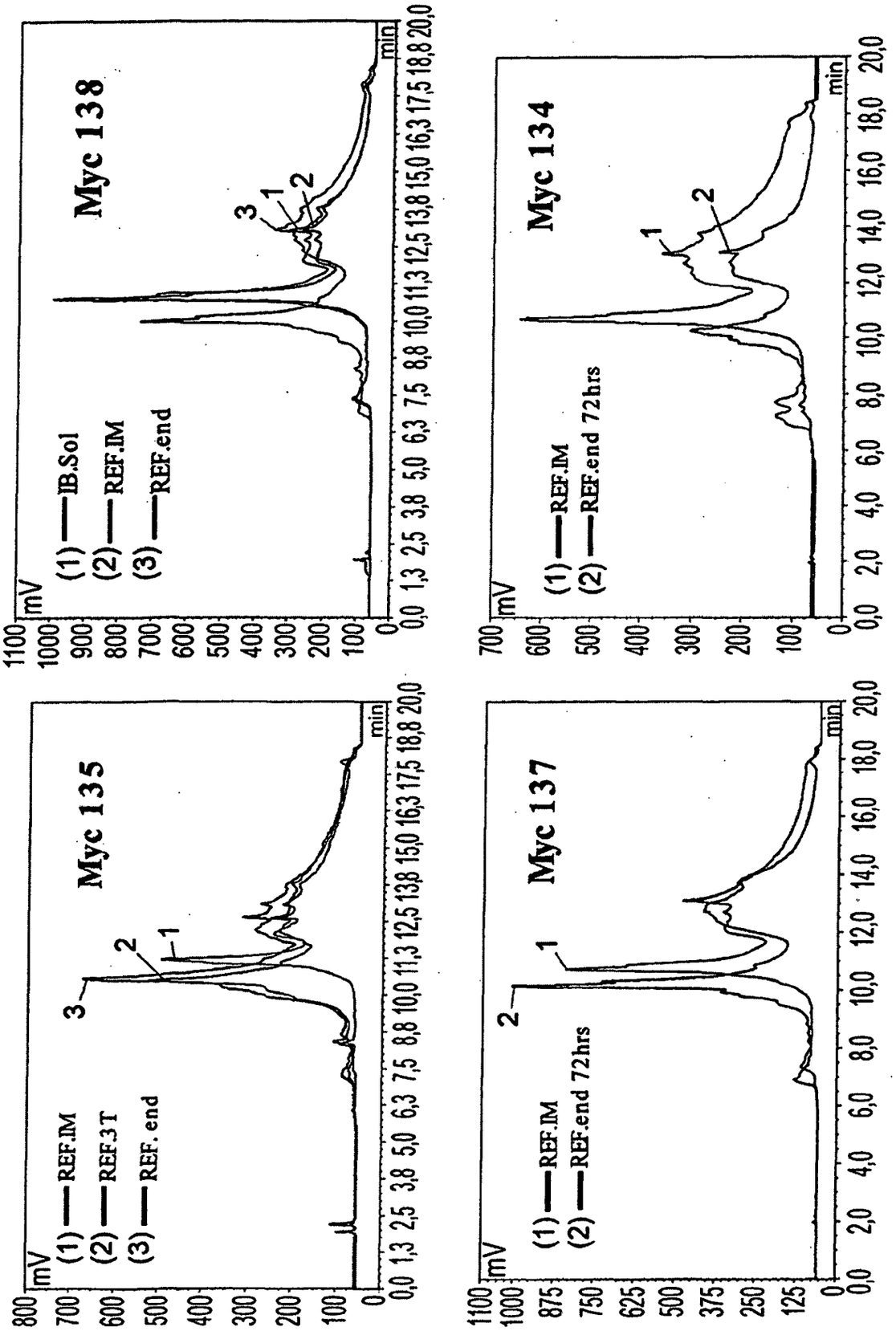


Fig. 22 (continued)

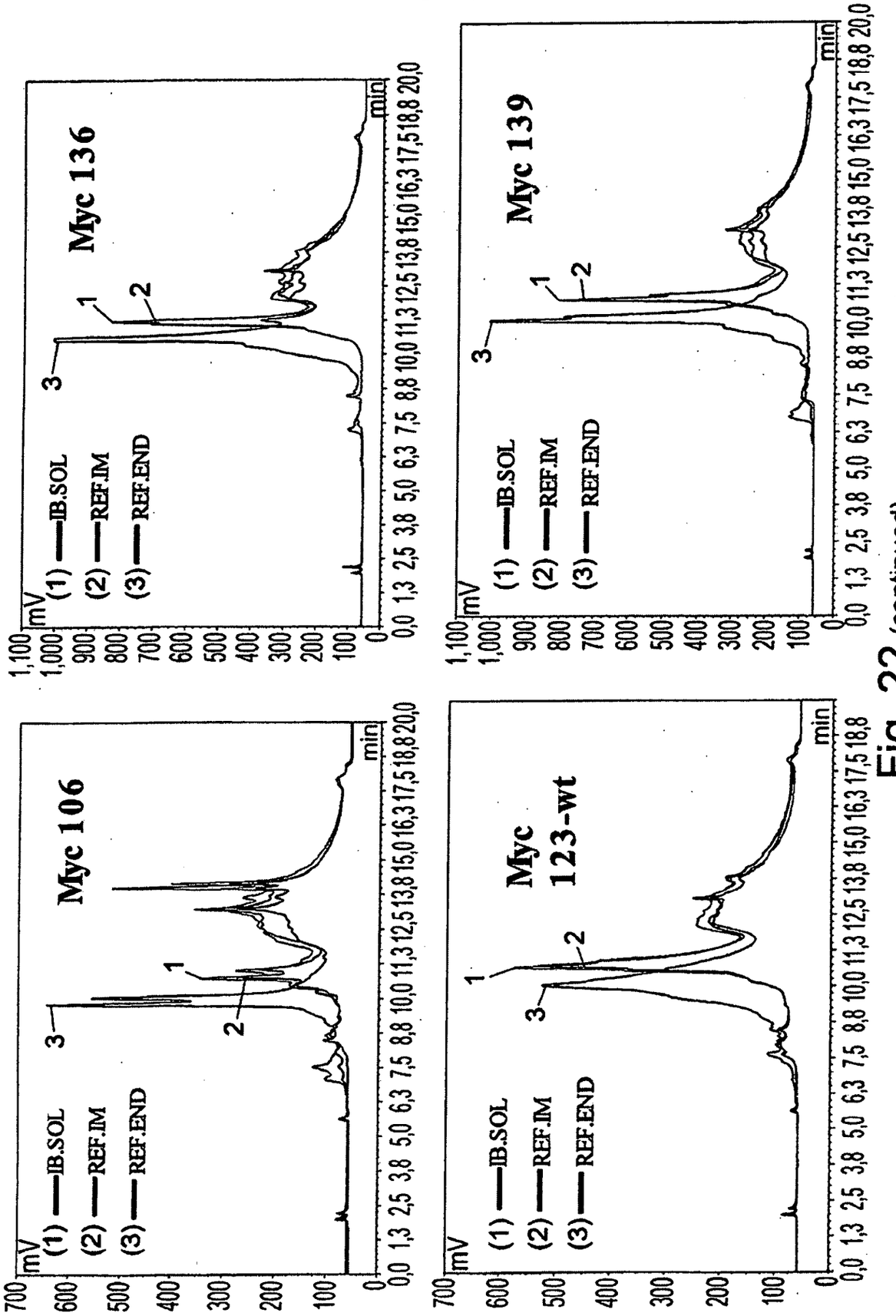


Fig. 22 (continued)

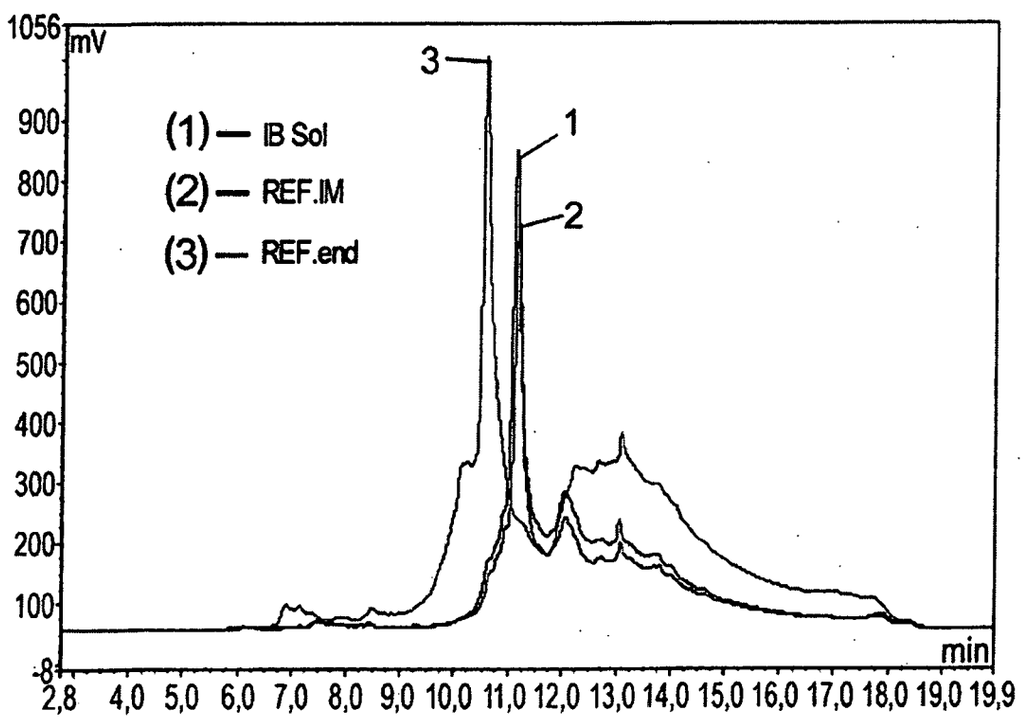


Fig. 22 (continued)

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG

<120> Novel Antibody Molecules and Nucleic Acids

<130> 50886

<160> 70

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 771
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(771)

<400> 1

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                   10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205
```

```
acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac      768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
                245                 250                 255

tga                                                                  771


<210>  2
<211>  256
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  Synthetic Construct

<400>  2

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205
```

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 3
<211> 774
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<400> 3

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                   10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
```

195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

taa taa 774

<210> 4
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 4

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 5
<211> 756
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(756)

<400> 5

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                   10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
```

```
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctg gaa taa taa                      756
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu
                245                 250
```

<210> 6
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 6

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205
```

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu
245 250

<210> 7
<211> 756
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(756)

<220>
<221> misc_feature
<222> (85)..(87)
<223> A codon encoding an amino acid other than cysteine

<400> 7
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576

```
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctg gaa taa taa                      756
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu
                245                 250
```

<210> 8
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> The 'Xaa' at location 29 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, or Phe.

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 8

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
            20                  25                  30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160
```

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu
245 250

<210> 9
<211> 774
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<220>
<221> misc_feature
<222> (85)..(87)
<223> A codon encoding an amino acid other than cysteine

<400> 9
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser

130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

taa taa 774

<210> 10
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> The 'Xaa' at location 29 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, or Phe.

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 10

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 11
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 11

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp

99

100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 12
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 12

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 13
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<220>
<221> misc_feature
<222> (85)..(87)
<223> A codon encoding an amino acid other than cysteine

<400> 13
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr

```
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa                                      744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245
```

<210> 14
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> The 'Xaa' at location 29 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, or Phe.

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 14

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
            20                  25                  30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
```

65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 15
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 15
atg gcg gaa gtg cag ctg gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

```
agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa                                      744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245
```

<210> 16
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 16

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80
```

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 17
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<220>
<221> misc_feature
<222> (85)..(87)
<223> A codon encoding an amino acid other than cysteine

<400> 17
atg gcg gaa gtg cag ctg gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

```
tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa                                      744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245
```

<210> 18
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> The 'Xaa' at location 29 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, or Phe.

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 18

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
            20                  25                  30
```

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 19
<211> 774
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<400> 19
atg gcg gaa gtg cag ctg gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser

```
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac      768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
                245                 250                 255

taa taa                                                             774
```

<210> 20
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 20

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30
```

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 21
<211> 774
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<220>
<221> misc_feature
<222> (85)..(87)
<223> A codon encoding an amino acid other than cysteine

<400> 21

```
atg gcg gaa gtg cag ctg gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                  10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac      768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
                245                 250                 255

taa taa                                                             774
```

<210> 22
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> The 'Xaa' at location 29 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, or

Phe.

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 22

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
            20                  25                  30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
                245                 250                 255
```

<210> 23
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 23

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                  10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc tcc ctg agc gcg agc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa                                      744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245
```

<210> 24
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 24

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 25
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 25

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                   10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat att cag atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc tcc ctg agc gcg agc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa                                      744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245
```

<210> 26
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 26

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 27
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

115

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 27
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg agc agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat att cag atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa aaa 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc agc agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 28
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
                165                 170                 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245
```

<210> 29
<211> 759
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(759)

<400> 29

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                  10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
    130                 135                 140

gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt      480
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
145                 150                 155                 160

atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg      528
Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
                165                 170                 175

tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct      576
Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
            180                 185                 190

gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc      624
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
        195                 200                 205

agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat      672
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
    210                 215                 220

ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc      720
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
225                 230                 235                 240

ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa                  759
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245                 250
```

<210> 30
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 30

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
130 135 140

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
145 150 155 160

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
180 185 190

Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250

<210> 31
<211> 762
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(762)

<400> 31

```
atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt       48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1               5                  10                  15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc       96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
            20                  25                  30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg      144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc      192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa      240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg      288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
                85                  90                  95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt      336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
            100                 105                 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc      384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

ggc ggc agc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa      432
Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
    130                 135                 140

aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc      480
Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile
145                 150                 155                 160

atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc      528
Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
                165                 170                 175

ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac      576
Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr
            180                 185                 190

agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att      624
Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
        195                 200                 205

aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg      672
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
    210                 215                 220

atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat      720
Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp
225                 230                 235                 240

tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc taa taa              762
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                245                 250
```

<210> 32
<211> 252
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 32

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile
145 150 155 160

Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr
180 185 190

Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
195 200 205

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220

Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp
225 230 235 240

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 33
<211> 774
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(774)

<220>
<221> misc_feature
<222> (292)..(294)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 33

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                  10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac nnn gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Xaa Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac      768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
                245                 250                 255

taa taa                                                             774
```

<210> 34
<211> 256

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (98)..(98)
<223> The 'Xaa' at location 98 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, or Phe.

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 34

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Xaa Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 35
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 35

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg        48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                   10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct        96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa       144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg       192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cgt gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc       240
Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac       288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg       336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt       384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat att cag atg acc cag agc       432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc tcc ctg agc gcg agc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc       480
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca       528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa       576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc       624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac       672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa       720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa                                      744
```

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 36
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 36

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 37
<211> 744
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 37

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                   10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cgt gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg agc agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat att cag atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc tcc ctg agc gcg agc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa aaa      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc agc agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa      720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa                                      744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
```

245

<210> 38
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 38

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 39
<211> 774
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<400> 39

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                   10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg      480
Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
145                 150                 155                 160

ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc      528
Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile
                165                 170                 175

agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa      576
Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys
            180                 185                 190

ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt      624
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
        195                 200                 205

ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc      672
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
    210                 215                 220

ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc      720
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser
225                 230                 235                 240

tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg      768
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245                 250                 255
```

taa taa 774

<210> 40
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 40

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
145 150 155 160

Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile
165 170 175

Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys
180 185 190

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
195 200 205

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
210 215 220

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser
225 230 235 240

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250 255

<210> 41
<211> 789
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(789)

<400> 41

```
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                   10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac      288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc gga tct ggt ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc ccg      480
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
145                 150                 155                 160

agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc      528
Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg
                165                 170                 175

gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg      576
Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro
            180                 185                 190

ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa acc      624
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr
        195                 200                 205

ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc      672
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
    210                 215                 220

ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc      720
Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
225                 230                 235                 240

caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg      768
Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
```

245 250 255

gac atc aaa cgc gcg taa taa 789
Asp Ile Lys Arg Ala
260

<210> 42
<211> 261
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 42

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg
165 170 175

Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro
180 185 190

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr
195 200 205

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
210 215 220

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
225 230 235 240

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

Asp Ile Lys Arg Ala
260

<210> 43
<211> 777
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(777)

<400> 43

```
atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt       48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1               5                   10                  15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc       96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
            20                  25                  30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg      144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc      192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa      240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg      288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
                85                  90                  95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt      336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
            100                 105                 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc tcc ggt ggt      384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct      432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
    130                 135                 140

ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa      480
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
145                 150                 155                 160

ggt tct ggt tgc atc atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag      528
Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln
                165                 170                 175

atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac      576
Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp
            180                 185                 190

agc tat att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc      624
Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
        195                 200                 205

gcc gat aaa agc att aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa      672
Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys
    210                 215                 220
```

gcg agc gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc 720
Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe
225 230 235 240

ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc 768
Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255

agc taa taa 777
Ser

<210> 44
<211> 257
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 44

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
145 150 155 160

Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln
165 170 175

Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp
180 185 190

Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
195 200 205

Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys

210 215 220

Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe
225 230 235 240

Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255

Ser

<210> 45
<211> 792
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(792)

<400> 45

```
atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt       48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1               5                  10                  15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc       96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
            20                  25                  30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg      144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc      192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa      240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg      288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
                85                  90                  95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt      336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
            100                 105                 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tct ggt ggt ggc ggc agc ggt ggt      384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gct gaa gtt      432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val
    130                 135                 140

caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg      480
Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
145                 150                 155                 160

cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct tct tac tgg atc      528
Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile
                165                 170                 175

agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa      576
Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys
            180                 185                 190
```

```
att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc      624
Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
        195                 200                 205

cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc gct tac ctg caa      672
His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
    210                 215                 220

tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt      720
Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225                 230                 235                 240

ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc      768
Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                245                 250                 255

ctg gtg acc gtg agc agc taa taa                                     792
Leu Val Thr Val Ser Ser
            260
```

<210> 46
<211> 262
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 46

```
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1               5                   10                  15

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
            20                  25                  30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
                85                  90                  95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val
    130                 135                 140

Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
145                 150                 155                 160

Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile
                165                 170                 175

Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys
            180                 185                 190
```

Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
195 200 205

His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
210 215 220

Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240

Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser
260

<210> 47
<211> 759
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(759)

<400> 47
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
130 135 140

gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt 480
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
145 150 155 160

atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg 528

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
165 170 175

tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct 576
Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
180 185 190

gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc 624
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat 672
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc 720
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
225 230 235 240

ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 759
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250

<210> 48
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 48

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
130 135 140

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
145 150 155 160

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
180 185 190

Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250

<210> 49
<211> 774
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<400> 49
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg 480
Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
145 150 155 160

ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc 528
Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile

136

```
                165                 170                 175

agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa      576
Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys
            180                 185                 190

ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt      624
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
        195                 200                 205

ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc      672
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
    210                 215                 220

ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc      720
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser
225                 230                 235                 240

tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg      768
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
                245                 250                 255

taa taa                                                             774


<210>  50
<211>  256
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  Synthetic Construct

<400>  50

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


Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
            20                  25                  30


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


Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60


Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80


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


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


Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125


Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140


Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
145                 150                 155                 160


Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile
                165                 170                 175
```

Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys
180 185 190

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
195 200 205

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
210 215 220

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser
225 230 235 240

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250 255

<210> 51
<211> 789
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(789)

<400> 51
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tct ggt ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

ggc ggc agc ggc ggc ggt ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc ccg 480
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc 528

```
Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg
                165                 170                 175

gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg      576
Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro
            180                 185                 190

ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa acc      624
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr
        195                 200                 205

ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc      672
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
    210                 215                 220

ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc      720
Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
225                 230                 235                 240

caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg      768
Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
                245                 250                 255

gac atc aaa cgc gcg taa taa                                          789
Asp Ile Lys Arg Ala
            260
```

<210> 52
<211> 261
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 52

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
            20                  25                  30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
145                 150                 155                 160
```

Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg
165 170 175

Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro
180 185 190

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr
195 200 205

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
210 215 220

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
225 230 235 240

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

Asp Ile Lys Arg Ala
260

<210> 53
<211> 762
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(762)

<400> 53
atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc 384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

ggc ggc agc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa 432
Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys

130 135 140

aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc 480
Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser
145 150 155 160

atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc 528
Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175

ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac 576
Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr
180 185 190

agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att 624
Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
195 200 205

aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg 672
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220

atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat 720
Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp
225 230 235 240

tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc taa taa 762
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 54
<211> 252
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 54

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser
145 150 155 160

Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr
180 185 190

Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
195 200 205

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220

Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp
225 230 235 240

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 55
<211> 777
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(777)

<400> 55
atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat gct gca agc act ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc tcc ggt ggt 384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct 432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa 480
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
145 150 155 160

ggt tct ggt tat agc atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag 528
Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln
165 170 175

atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac 576
Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp
180 185 190

agc tat att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc 624
Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
195 200 205

gcc gat aaa agc att aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa 672
Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys
210 215 220

gcg agc gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc 720
Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe
225 230 235 240

ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc 768
Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255

agc taa taa 777
Ser

<210> 56
<211> 257
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 56

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

130 135 140

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
145 150 155 160

Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln
165 170 175

Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp
180 185 190

Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
195 200 205

Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys
210 215 220

Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe
225 230 235 240

Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255

Ser

<210> 57
<211> 792
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(792)

<400> 57
atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

```
ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tct ggt ggt ggc ggc agc ggt ggt      384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gct gaa gtt      432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val
    130                 135                 140

caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg      480
Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
145                 150                 155                 160

cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct tct tac tgg atc      528
Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Tyr Trp Ile
                165                 170                 175

agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa      576
Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys
            180                 185                 190

att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc      624
Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
        195                 200                 205

cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc gct tac ctg caa      672
His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
    210                 215                 220

tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt      720
Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225                 230                 235                 240

ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc      768
Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                245                 250                 255

ctg gtg acc gtg agc agc taa taa                                     792
Leu Val Thr Val Ser Ser
            260
```

<210> 58
<211> 262
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 58

```
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1               5                   10                  15

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
            20                  25                  30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
                85                  90                  95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
            100                 105                 110
```

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val
130 135 140

Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
145 150 155 160

Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Tyr Trp Ile
165 170 175

Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys
180 185 190

Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
195 200 205

His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
210 215 220

Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240

Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser
260

<210> 59
<211> 837
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(837)

<400> 59
atg aaa tac ctg ctg ccg acc gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct 48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

gcc cag ccg gcg atg ccc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct 96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
20 25 30

gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct 144
Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
35 40 45

ggt tgc atc atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg 192
Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro
50 55 60

ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat 240
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr
65 70 75 80

att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat 288

Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp
85 90 95

aaa agc att aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc 336
Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser
100 105 110

gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat 384
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp
115 120 125

agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt 432
Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt 480
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
145 150 155 160

gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt 528
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
165 170 175

atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg 576
Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
180 185 190

tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct 624
Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
195 200 205

gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc 672
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220

agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat 720
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225 230 235 240

ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc 768
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
245 250 255

ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac 816
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
260 265 270

cac cac cac cac cac taa taa 837
His His His His His
275

<210> 60
<211> 277
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 60

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
20 25 30

Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
35 40 45

Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro
50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr
65 70 75 80

Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp
85 90 95

Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser
100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp
115 120 125

Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
145 150 155 160

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
165 170 175

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
195 200 205

Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225 230 235 240

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
260 265 270

His His His His His
275

<210> 61
<211> 837
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(837)

<400> 61
atg aaa tac ctg ctg ccg acc gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct 48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

gcc cag ccg gcg atg gcc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct 96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala

150

```
            20                  25                  30

gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct      144
Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
        35                  40                  45

ggt tat atc atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg      192
Gly Tyr Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro
    50                  55                  60

ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat      240
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr
65                  70                  75                  80

att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat      288
Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp
                85                  90                  95

aaa agc att aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc      336
Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser
            100                 105                 110

gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat      384
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp
        115                 120                 125

agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt      432
Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
    130                 135                 140

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt      480
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
145                 150                 155                 160

gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt      528
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
                165                 170                 175

atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg      576
Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
            180                 185                 190

tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct      624
Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
        195                 200                 205

gca agc acc ctg caa act ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc      672
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    210                 215                 220

agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat      720
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225                 230                 235                 240

ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc      768
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
                245                 250                 255

ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac      816
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
            260                 265                 270

cac cac cac cac cac taa taa                                         837
His His His His His
        275
```

<210> 62
<211> 277
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 62

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
20 25 30

Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro
50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr
65 70 75 80

Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp
85 90 95

Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser
100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp
115 120 125

Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
145 150 155 160

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
165 170 175

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
195 200 205

Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225 230 235 240

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
260 265 270

His His His His His
275

<210> 63
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Heavy chain of scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 63
gct gaa gtt caa ctt gtt caa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt 48
Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct tct 96
Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser
20 25 30

tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg 144
Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg agc 192
Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc gct 240
Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala
65 70 75 80

tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac tac 288
Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95

tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt 336
Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 64

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

Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser
20 25 30

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

Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Light chain from scFv peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 65
gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt 48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly
1 5 10 15

gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat 96
Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt 192
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg 240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg 327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 66
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Corstruct

<400> 66

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

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 67
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pelB signal sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(66)

<400> 67
atg aaa tac ctg ctg ccg acc gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct 48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

gcc cag ccg gcg atg gcc 66
Ala Gln Pro Ala Met Ala
20

<210> 68
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 68

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala
20

<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> Candida albicans

<400> 69

Asn Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys
1 5 10

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Scrambled peptide

<400> 70

Ser Phe Lys Trp Gly Val Thr Thr Ser Leu Ser Tyr Phe Pro Lys
1 5 10 15

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
6 de Noviembre de 2008 (06.11.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/132134 A9

(51) Clasificación de Patente Internacional:
C07K 16/14 (2006.01) *C12N 15/10 (2006.01)*
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/18 (2006.01)*
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 37/06 (2006.01)*
A61K 35/00 (2006.01)

(21) Número de solicitud Internacional:
PCT/EP2008/055006

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de Abril de 2008 (24.04.2008)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos de prioridad:

07107140.1	27 de Abril de 2007 (27.04.2007)	EP
07113353.2	27 de Julio de 2007 (27.07.2007)	EP

(71) Solicitante: *(para todos los estados designados, excepto US):* **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes: *(solo para US,)*: **BURNIE, James** [GB/GB]; 1 Gresytoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SK9 7PY (GB). **WECHNER, Philipp** [AT/AT]; Hussistrasse 27c, A6130 Schwaz (AT).

(74) Agente: **GRUBER, Markus,** Novartis Pharma AG, Patent Department, CH-4002 Basilea (CH).

(81) Estados Designados (*a menos que se indique de otra manera, para cada clase de protección nacional disponible):* AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (*a menos que se indique de otra manera, para cada clase de protección regional disponible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada
- *con reporte de búsqueda internacional*
- Con lista de secuencias parte de la descripción publicada por separado en forma electrónica y disponible bajo forma de requerimiento de la Oficina Internacional

(48) Fecha de publicación de la versión correcta:
9 de Julio de 2009

(15) Información sobre la corrección:
Ver nota del 9 de julio de 2009.

(54) Título: NOVEDOSAS MOLÉCULAS DE ANTICUERPOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE SE ENLAZAN CON LA PROTEINA DE TENSION FUNGICA HSP90

(57) Resumen:
Se da a conocer un péptido scFv, el cual comprende un dominio V_H y un dominio V_L enlazados por un espaciador de aminoácidos. El dominio V_H comprende una secuencia con una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:64. El dominio V_L comprende una secuencia con una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:66. El péptido scFv también comprende la sustitución o la supresión de un aminoácido en el dominio V_H en la posición correspondiente a C_{28}.

NOVEDOSAS MOLÉCULAS DE ANTICUERPOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE SE ENLAZAN CON LA PROTEINA DE TENSION FUNGICA HSP90

La presente invención se refiere a novedosas moléculas de anticuerpos que se enlazan específicamente con la proteína de tensión fúngica hsp90, a ácidos nucleicos que codifican estos péptidos, y a composiciones farmacéuticas y usos de los mismos.

Un fragmento de anticuerpo que se enlaza con la proteína de tensión fúngica hsp90, así como sus usos terapéuticos, se han descrito, por ejemplo, en las Publicaciones Internacionales Números WO01/76627 ó WO05/102386. El fragmento de anticuerpo, también conocido como *Mycograb*® (Efungumab), es una proteína de fusión que comprende los dominios V_H y V_L de inmunoglobulina conectados por un péptido enlazador. Estos fragmentos de anticuerpo, también son conocidos como "fragmento variable de una sola cadena" (scFv). *Mycograb*® es producido mediante la fermentación de *E. coli* en la forma de cuerpos de inclusión, los cuales se extraen de la masa celular, se repliegan, y subsecuentemente se purifica mediante pasos cromatográficos bajo condiciones desnaturalizantes. Los estudios de caracterización llevados a cabo bajo condiciones nativas han indicado que la proteína efungumab tiene tendencia a formar multímeros o agregados (los términos "multímeros" y "agregados" se utilizan de una manera intercambiable en la presente). Estos agregados, en particular los agregados de alto peso molecular,

pueden no ser deseables para usos terapéuticos. Por consiguiente, para usos terapéuticos, puede ser deseable eliminar o reducir los agregados de alto peso molecular, o controlar la acumulación, de tal manera que el número de monómeros, que contienen una mayoría de estos agregados, estén en cierto intervalo, por ejemplo, entre 10 y 100 monómeros, tal como, por ejemplo, entre 11 y 72 o entre 26 y 57 monómeros.

La presente invención proporciona ahora mejores péptidos de scFv que se enlazan con la proteína de tensión fúngica hsp90, los cuales tienen propiedades convenientes con respecto, por ejemplo, a las propiedades de repliegue y/o a la formación de agregados. Los péptidos de la invención, por lo tanto, son particularmente útiles para usos terapéuticos.

De conformidad con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido de scFv que comprende un dominio V_H y un dominio V_L enlazados por un espaciador de aminoácidos, en donde el dominio V_H comprende una secuencia con una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:64, y el dominio V_L comprende una secuencia con una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:66, y en donde el péptido de scFv comprende una característica adicional seleccionada a partir del grupo que consiste en:

(a) una sustitución o supresión de un aminoácido en el dominio V_H en una posición correspondiente a aquélla seleccionada a

partir del grupo que consiste en: C_{28}, I_{29}, H_{68}, N_{85}, C_{97} y combinaciones de las mismas;

(b) una sustitución o supresión de un aminoácido en el dominio V_L, en una posición correspondiente a aquélla seleccionada a partir del grupo que consiste en: V_2, V_3, F_{10}, F_{14}, A_{39}, N_{76} y combinaciones de las mismas;

(c) el espaciador de aminoácidos comprende la secuencia $(GGGGS)_n$, en donde **n** es entre 4 y 6;

(d) el dominio V_H comprende además una secuencia de señal pelB N-terminal que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:68, o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la misma;

(e) el dominio V_L se localiza en el extremo N-terminal del dominio V_H; y

(f) combinaciones de las características (a) a (e).

Se prefiere que el dominio V_H comprenda una secuencia con una identidad de cuando menos el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:64. También se prefiere que el dominio V_L comprenda una secuencia con una identidad de cuando menos el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:66. Se debe entender que la característica adicional está presente sin importar el nivel de identidad de secuencias. Por ejemplo, si la característica adicional es una sustitución del aminoácido en la posición C_{28}, entonces esta sustitución está

presente inclusive en las modalidades en donde el dominio V_H comprenda una secuencia con una identidad de secuencia de solamente el 80 por ciento con la SEQ ID NO:64.

De una manera conveniente, la sustitución del aminoácido en el dominio V_H se selecciona a partir del grupo que consiste en: $C_{28}Y$, $C_{28}S$, $I_{29}S$, $H_{68}R$, $N_{85}S$, $C_{97}Y$, $C_{97}S$ y combinaciones de las mismas. Se prefiere particularmente la sustitución $C_{28}Y$.

Convenientemente, la sustitución del aminoácido en el dominio V_L se selecciona a partir del grupo que consiste en: V_2I, V_3Q, $F_{10}S$, $F_{14}S$, $A_{39}K$, $N_{76}S$ y combinaciones de las mismas.

De preferencia, el péptido scFv comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62, en donde Xaa denota un residuo de aminoácido diferente de cisteína, y en donde el residuo de metionina N-terminal puede disociarse opcionalmente. Se prefiere que Xaa denote un residuo de tirosina.

En una modalidad, Xaa es Tyr (Y). En otra modalidad, Xaa es Ala (A), Leu (L), Ile (I), Val (V), Pro (P) ó Met (M); en todavía otra modalidad, Xaa es Phe (F) ó Tyr (W); en todavía otra modalidad, Xaa es Gly (G); en todavía otra modalidad, X es Ser (S) ó Thr (T); en todavía otra modalidad, Xaa es Glu (E) ó Asp (D); en todavía otra modalidad, Xaa es Gln (Q) ó Asn (N); en todavía otra modalidad, Xaa es Arg (R), Lys (K) ó His (H).

De una manera preferible, el péptido scFv comprende además

160

una marca de purificación, más preferiblemente una secuencia de seis residuos de histidina en el término C.

De conformidad con otra modalidad de la presente invención, se proporciona un péptido scFv que consiste en, o que consiste esencialmente en, una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62, en donde estos péptidos pueden comprender opcionalmente una marca de purificación, tal como, por ejemplo, una marca-His (por ejemplo, como se estipula en las SEQ ID NOs:10, 22, ó 34).

Las marcas de purificación típicamente no contribuyen al efecto terapéutico de la molécula, y por consiguiente, se pueden remover después de la purificación de los fragmentos scFv de la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido scFv, que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62. En una modalidad, se proporciona un péptido scFv que consiste en, o que consiste esencialmente en, una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62, en donde estos péptidos pueden comprender también opcionalmente una marca de purificación, tal como, por ejemplo, una marca-His (por ejemplo,

Patente De Invención

09-119382

Tomo: 2/3

como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, ó 20).

Como será fácilmente apreciado por la persona experta, el primer residuo de Met de los péptidos de la presente invención también se puede disociar *in vivo*, por ejemplo mediante MAP de *E. coli* (amino-peptidasa de metionina), si se expresa en *E. coli*.

Los péptidos scFv de la presente invención comprenden dos dominios enlazados por un espaciador de aminoácidos (los términos "espaciador" y "enlazador" se utilizan de una manera intercambiable), por ejemplo, que tenga la secuencia de aminoácidos $(GGGGS)_n$, en donde **n** es un entero de 1 a 12, por ejemplo de 1, 2, 3, 4, ó 5. Uno de los dominios, designados como V_H, corresponde a la parte de la cadena pesada del fragmento de anticuerpo (correspondiente, por ejemplo, a los residuos de aminoácidos 2 a 122 en el fragmento scFv de la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO:2 y en la SEQ ID NO:30, o los residuos de aminoácidos 132 a 152 en la SEQ ID NO:32). El otro dominio, designado como V_L, corresponde a la parte de la cadena ligera del fragmento de anticuerpo (correspondiente, por ejemplo, a los residuos de aminoácidos 138 a 246 en la SEQ ID NO:2, o a los residuos de aminoácidos 138 a 246 en la SEQ ID NO:12, o a los residuos aminoácidos 2 a 110 en la SEQ ID NO:32). El dominio V_H ó V_L se puede localizar en el término N de los péptidos scFv de la presente invención, es decir, las moléculas pueden enlazarse como sigue: V_H-enlazador-V_L ó V_L-enlazador-V_H.

La secuencia de señal pelB opcional, da como resultado la

localización subcelular del péptido en la membrana periplásmica, cuando se expresa en *E. coli*, con el objeto de mejorar la solubilidad del péptido.

En una modalidad, se proporciona un fragmento scFv que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:30 ó 32. En otra modalidad, se proporciona un péptido scFv que consiste en, o que consiste esencialmente en, una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:30 ó 32, en donde estos péptidos pueden comprender también opcionalmente una marca de purificación, tal como, por ejemplo, una marca-His.

En un aspecto, la presente invención proporciona fragmentos scFv que comprenden un dominio V_H y V_L, y un enlazador de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 30, 32 ó 34), que tienen cuando menos un aminoácido sustituido en una o más de las siguientes posiciones: C29X, I30X, H69X, N86X, C98X, V139X, V140X, F147X, F151X, A176X, N213X, en donde X denota un aminoácido diferente del que se estipula en la SEQ ID NO:2 (la numeración es como se estipula en la SEQ ID NO:2, y las posiciones de aminoácidos correspondientes en otros mutantes se pueden determinar fácilmente). En una modalidad preferida, la presente invención proporciona fragmentos scFv que tienen cuando menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: C29Y ó C29S, I30S, H69R, N86S, C98Y ó C98S, V139I, V140Q, F147S, F151S,

163

A176K, N213S. Se debe apreciar que la numeración de los aminoácidos en relación con este aspecto incluye al residuo de metionina N-terminal.

En una modalidad, se proporciona un fragmento scFv que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:24, 26, ó 28. En otra modalidad, se proporciona un péptido scFv que consiste en, o que consiste esencialmente en, una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:24, 26, ó 28, en donde estos péptidos pueden comprender también opcionalmente una marca de purificación, tal como, por ejemplo, una marca -His.

Los péptidos de la presente invención son útiles como productos terapéuticos. De conformidad con lo anterior, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido scFv de acuerdo con la presente invención, por ejemplo que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62, en donde Xaa se define como anteriormente, en combinación con un excipiente, diluyente, o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los detalles de los excipientes adecuados se proporcionan en Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopoeia, 1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, EUA. Los excipientes de ejemplo incluyen urea de grado farmacéutico (Farmacopea Europea) y L-

164

Arginina (Farmacopea Europea). Por ejemplo, una formulación típica de un péptido scFv de la invención es de 10 miligramos del péptido scFv puro, de 150 miligramos de urea de grado farmacéutico (Farmacopea Europea), y 174 miligramos de L-arginina (Farmacopea Europea) reconstituidos en 5 mililitros de agua.

Un péptido scFv o una composición farmacéutica de la invención, se puede administrar en una dosificación en el intervalo de 0.1 a 10 miligramos/kilogramo de peso corporal del paciente. Se prefiere una dosificación en el intervalo de 0.5 a 5 miligramos/kilogramo de peso corporal, prefiriéndose de una manera particular una dosificación de alrededor de 1 miligramo/kilogramo. La composición farmacéutica se puede administrar oralmente.

Los péptidos de la presente invención son útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas, por ejemplo, como se da a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO01/76627 ó WO05/102386, cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia. Por ejemplo, los péptidos de la presente invención son útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, tales como candidiasis invasiva o aspergilosis invasiva o meningitis invasiva, por ejemplo, las especies de Cándida virulentas *C. albicans, C. tropicalis* y *C. krusei,* y las especies menos virulentas *C. parapsilosis* y *Torulopsis glabrata.* Los péptidos de la presente invención también son útiles en el tratamiento de infecciones por *Candida, Cryptococcus, Histoplasma, Aspergillus, Torulopsis, Mucormycosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis,* organismo de

Paracoccidioidomycosis o malaria. De conformidad con lo anterior, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un paciente con una infección fúngica, el cual comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un péptido scFv de la presente invención, por ejemplo, comprendiendo una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62, en donde Xaa es como se define anteriormente. La Met N-terminal opcionalmente se puede disociar.

Los péptidos de la presente invención son particularmente útiles para terapias de combinación. De conformidad con lo anterior, en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición o una preparación combinada que comprende un péptido scFv de la presente invención, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62 (la Met N-terminal opcionalmente se puede disociar), en donde Xaa es como se define anteriormente, y un agente antifúngico, tal como, por ejemplo, un antifúngico de polieno o un antifúngico de equinocandina, o un antifúngico de azol. Los ejemplos de los antifúngicos útiles como componentes de combinación de los péptidos scFv de la presente invención incluyen, por ejemplo, anfotericina B, derivados de anfotericina B, tales como AmBisome, complejo de lípido con anfotericina-B (Abelcet), dispersión coloidal de anfotericina B (Amphocil), y emulsión

166

intralípida de anfotericina-B; nistatina; 5-fluoro-citocina; caspofungina, anidulafungina, micafungina, LY303366; azoles, tales como isavuconazol, voriconazol, itraconazol, fluconazol, miconazol, quetoconazol, posaconazol, anidulafungina, micafungina, griseofulvina, terbinafina. Aunque esta combinación puede ser una combinación de dosis fija, en general, el péptido scFv y su componente de combinación no se empacan como combinaciones de dosis fija.

Las preparaciones combinadas de la presente invención pueden ser para uso simultáneo, separado, o en secuencia, en el tratamiento de infecciones fúngicas. Los péptidos de la presente invención también se pueden utilizar en combinación con más de un agente antifúngico, por ejemplo con anfotericina B y 5-fluoro-citosina, una fungina y anfotericina B, o una equinocandina más azol.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un paciente con una infección fúngica, el cual comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un péptido scFv de la presente invención, por ejemplo comprendiendo una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62 (la Met N-terminal opcionalmente se puede disociar), en donde Xaa se define como anteriormente, y cuando menos uno de los agentes anti-fúngicos descritos anteriormente. Los componentes de combinación preferidos son anfotericina B o derivados de anfotericina B,

caspofungina, anidulafungina, micafungina, voriconazol, itraconazol. Los componentes de combinación se pueden administrar de una manera simultánea, separada, o en secuencia.

En una modalidad de la presente invención, el hongo que provoca la infección es resistente o parcialmente resistente contra un componente de combinación antifúngico de los péptidos de la invención.

Los péptidos de la presente invención también son útiles en el tratamiento de cáncer, o de una condición que involucre niveles elevados de TNFα y/o IL-6, tales como enfermedad auto-inmunes o sepsis, por ejemplo como se da a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO06/003384 ó WO07/077454 (PCT/GB2007/000029), cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia. Por ejemplo, los péptidos de la presente invención son útiles en el tratamiento de leucemia, tal como, por ejemplo, leucemia linfoide (linfocítica) (CLL), leucemia mieloide aguda (mieloblástica) (AML), leucemia linfoide aguda (linfoblástica (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), carcinoma de mama, carcinoma del colon, de próstata, mieloma múltiple; o para el tratamiento de sepsis con dirección a la hsp90 humana (Publicación Internacional Número WO07/077454). De conformidad con lo anterior, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un paciente con una enfermedad de cáncer, o con una condición que involucre niveles elevados de TNFα y/o IL-6 (enfermedad auto-inmune, SIRS, o sepsis), el cual comprende

administrar al paciente una cantidad efectiva de un péptido scFv de la presente invención, por ejemplo, comprendiendo una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62 (la Met N-terminal opcionalmente se puede disociar), en donde Xaa se define como anteriormente.

En algunas modalidades, la enfermedad auto-inmune es enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, o lupus eritematoso sistémico.

Los péptidos de la presente invención son útiles para terapias de combinación con agentes contra el cáncer. Los ejemplos de los agentes contra el cáncer adecuados incluyen doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina, herceptina, docetaxel, cisplatina, imatinib (Gleevec®), paclitaxel, citarabina, o hidroxi-urea. De conformidad con lo anterior, la presente invención proporciona una composición o una preparación combinada que comprende un péptido scFv de la presente invención, por ejemplo que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62 (la Met N-terminal opcionalmente se puede disociar), en donde Xaa se define como anteriormente, y un agente contra el cáncer seleccionado a partir del grupo que consiste en doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina, herceptina, docetaxel, cisplatina, imatinib, paclitaxel, e hidroxi-urea. También se proporcionan métodos para el tratamiento de un paciente

169

con una enfermedad de cáncer, los cuales comprenden administrar al paciente que lo necesite, una cantidad efectiva de un scFv de la presente invención, por ejemplo un péptido que comprenda una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 y 62 (la Met N-terminal opcionalmente se puede disociar), en donde Xaa se define como anteriormente, y cuando menos un agente contra el cáncer seleccionado a partir del grupo que consiste en doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina, herceptina, docetaxel, cisplatina, imatinib, paclitaxel, e hidroxi-urea.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos mejoradas que codifican los péptidos scFv, como se describen, y mejores construcciones de ácidos nucleicos, que son particularmente útiles para expresar estos péptidos scFv, por ejemplo en *E. coli*. Las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención, por ejemplo, conducen a una mejor expresión de los péptidos scFv en *E. coli*, por ejemplo, con respecto a la homogeneidad y titulación del péptido scFv expresado.

De preferencia, la molécula de ácido nucleico comprende además la secuencia $(taa)_n$ localizada en el extremo 3' de la secuencia que codifica el péptido scFv, en donde **n** es 1 ó 2.

De conformidad con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un dominio V_H que comprende una secuencia

que tiene una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:64, y un dominio V_L que comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:66, y que además comprende la secuencia $(taa)_n$ localizada en el extremo 3' de la secuencia que codifica los dominios V_H ó V_L, en donde **n** es 1 ó 2. La provisión de múltiples codones de paro en el término 3' elimina los eventos erróneos de lectura atravesada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, por ejemplo una molécula de ADN o de ARN, la cual comprende una secuencia de nucleótidos como se estipula en las SEQ ID NOs:3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, ó 61, en donde nnn denota un codón que codifica para un aminoácido diferente de Cys. Por ejemplo, en una modalidad, nnn puede codificar para Tyr, por ejemplo, TAT. En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se estipula en las SEQ ID NOs:1, 3, 5, 11, 15 ó 19. Como será apreciado por la persona experta, las secuencias de ácido nucleico se pueden modificar fácilmente sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada. Las moléculas de ácido nucleico basadas en una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como se estipula en las SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49,

51, 53, 55, 57, 59, ó 61, con una o más (por ejemplo, hasta 10, 20, 50, ó 100) de estas mutaciones silenciosas, también están comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Además se abarcan las moléculas de ácido nucleico que tienen (1) una identidad de cuando menos el 80 por ciento, de preferencia una identidad de cuando menos el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento con las SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, ó 61; o (ii) se hibridan bajo condiciones de alta restringencia con las moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia como se estipula en las SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, ó 61. El término "condiciones de alta restringencia" es entendido fácilmente por la persona experta, y puede referirse, por ejemplo, a lavar en SSC 6x/pirofosfato de sodio al 0.05 por ciento a 37°C (para los oligonucleótidos de 14 bases), a 48°C (para los oligonucleótidos de 17 bases), a 55°C (para los oligonucleótidos de 20 bases), y a 60°C (para los oligonucleótidos de 23 bases). Los intervalos adecuados de estas condiciones de restringencia para los ácidos nucleicos de diferentes composiciones se describen en Krause y Aaronson (1991) Methods in Enzymology, 200:546-556.

En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de vector que comprende una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la invención, por ejemplo como se

estipula en las SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, ó 61. De una manera preferible, esta molécula de vector es adecuada para expresar las moléculas de ácido nucleico como se estipulan en las SEQ ID NOs:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, ó 61, en, por ejemplo, *E. coli*. Los vectores de expresión adecuados son fácilmente conocidos por la persona experta. Un ejemplo de un vector adecuado incluye, por ejemplo, pGEX ó pET. Otra modalidad proporciona una célula huésped, por ejemplo *E. coli*, que comprende esta molécula de vector.

En otra modalidad, se proporciona un método para producir un péptido scFv de la presente invención, por ejemplo que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en las SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 ó 62 (la Met N-terminal opcionalmente se puede disociar), en donde Xaa se define como anteriormente, el cual comprende cultivar una célula huésped que tenga incorporado en la misma un vector de expresión que contenga, bajo el control de elementos de control de transcripción adecuados, una secuencia de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico de la invención, por ejemplo, como se describe en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, ó 61, bajo condiciones suficientes para la expresión de estos péptidos en la célula huésped,

por ejemplo *E. coli*, provocando de esta manera la producción de este péptido; y recuperar el péptido producido por dicha célula.

El porcentaje de "identidad" entre dos secuencias se determina utilizando el algoritmo BLASTP versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-PLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402), utilizando los parámetros por omisión. En particular, el algoritmo BLAST se puede accesar en la Internet, utilizando la URL http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 es un diagrama que muestra esquemáticamente la secuencia del péptido scFv de *Mycograb* de tipo silvestre, y de los mutantes de *Mycograb*. También se muestran los codones de paro de las moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos respectivos en el extremo C-terminal.

La Figura 2 es un diagrama que muestra el principio del ensayo ELISA del Ejemplo 2.

La Figura 3 es una gráfica en donde las barras negras muestran el rendimiento después de la solubilización con NLS de todos los mutantes investigados. Las barras de error muestran la desviación estándar para las muestras analizadas dos veces. Las barras blancas son una representación gráfica del equilibrio de masa después del repliegue con NLS de todos los mutantes investigados. Los mutantes se clasifican de acuerdo con los valores de

recuperación de repliegue crecientes.

La Figura 4 muestra gráficas que indican la recuperación después del repliegue para cinco mutantes seleccionados, cuando se utilizó urea y DTT como el agente solubilizante (A), y cuando se utilizaron GuHCl y DTT como el agente solubilizante (B). Barras blancas: recuperación cuando se utilizó la masa de la proteína encontrada en la solución IB.SOL para el cálculo (ecuación 1). Barras negras: recuperación de repliegue cuando se utiliza para el cálculo la masa de proteína encontrada en la solución IB.RES.

La Figura 5 es una gráfica que muestra el tiempo requerido para una aclaración inicial visible de una solución de solubilización después de la adición de NLS al 4 por ciento (barras blancas), y el tiempo requerido hasta que ya no se observa aclaración adicional (barras negras), para todos los mutantes probados. Los mutantes se clasifican de acuerdo con el tiempo inicial en orden ascendente.

La Figura 6 es un diagrama de variabilidad para el principio de la solubilización de respuesta, e indica el número de cisteínas, el número de elementos enlazadores, y si el fragmento de cadena pesada (V_H) o de cadena ligera (V_L) estaba en el término N. 1: Myc 106 mutante tuvo el inicio de solubilización más rápido, pero contuvo cinco cisteínas.

La Figura 7 muestra cromatogramas como una sobrepuesta de muestras de extremo REF de los mutantes MYC 135, Myc 130, Myc 133, Myc 119, Myc 123 de tipo silvestre, y Myc 116.

La Figura 8 muestra los cromatogramas como una sobrepuesta

de las muestras de extremo REF de los mutantes MYC 134, Myc 137, Myc 138, Myc 106 Myc 136, Myc 123 y Myc 139.

La Figura 9 muestra las estimaciones a escala y un perfilador de predicción de los siguientes parámetros: longitud de enlazador, número de cisteínas, y configuración de Vh/Vl para el tiempo de retención de respuesta de los mutantes. Las estimaciones a escala predicen hasta qué grado cambiaría el tiempo de retención cuando se aumentara el parámetro desde el punto central (el número rojo en la gráfica del perfilador de predicción sobre el eje-x) hasta un nivel más alto.

La Figura 10 es una gráfica de la longitud del enlazador contra el tiempo de retención medido en RP-HPLC (RPC2) para los mutantes probados. Está resaltado el tiempo de retención temprano de MYC 130, comparándose con los otros mutantes.

La Figura 11 muestra una sobrepuesta normalizada de todas las muestras REF.END de las Figuras 7 y 8, para la estimación del área pico a partir del pico 2.

La Figura 12 muestra una sobrepuesta de cromatograma de RP-HPLC 2 de una muestra REF.End de MYC 119 solubilizado con urea 8M +DTT, urea 8M, GuHCl 6m + DTT, y GuHCl 6M; la dilución fue de 1:50 con un regulador que contenía Tris 20 mM, cisteína 2 mM, NLS al1 por ciento, pH de 9.0.

La Figura 13 es un cromatograma RPC 2 de una muestra REF.End de MYC 119 después de la solubilización con urea 6M y DTT 5 mM, y el subsiguiente repliegue mediante una dilución de

1:10.

La Figura 14 es una imagen de un gel siguiendo el análisis SDS-PAGE de la muestra REF.IM y REF.END de MYC 119, después de la solubilización con urea 6M y el repliegue mediante una dilución de 1:10 y de 1:50, respectivamente. Pistas 1 a 8: SDS-PAGE no reductor, pistas 9-14: SDS-PAGE reductor. R = reductor; n-r = no reductor.

La Figura 15 es una sobrepuesta del cromatograma de RP-HPLC (RPC 2) de una muestra de cuerpo de inclusión a partir del MYC 119 mutante, después de la solubilización con urea 6M (negra) y NLS al 4 por ciento (azul).

La Figura 16 muestra imágenes de: gel izquierdo: SDS-PAGE reductor (r) para los mutantes MYC 118, 119, 130, 133, 134, 135, y 137; y gel derecho: SDS-PAGE no reductor (n-r) de las mismas muestras.

La Figura 17 muestra las imágenes de: gel izquierdo: SDS-PAGE reductor para los mutantes MYC 106, 123 de tipo silvestre, 136, 138, 139, y 140; y gel derecho: SDS-PAGE no reductor de las mismas muestras.

La Figura 18 es una sobrepuesta de cromatogramas de SEC HPLC con NLS al 0.5 por ciento de las muestras REF.End para los mutantes MYC 118, Myc 119, Myc 130, Myc 133 y Myc 135. Las IBs de estos mutantes se aislaron a escala de banco.

La Figura 19 es una sobrepuesta de los cromatogramas de SEC HPLC con NLS al 0.5 por ciento de las muestras REF.End para los

mutantes Myc 134, Myc 136, Myc 137, Myc 138, Myc 139, Myc 140, Myc 106 y Myc 123 de tipo silvestre. Las IBs de estos mutantes se aislaron en la planta piloto.

La Figura 20 muestra una gráfica de dispersión y regresión lineal (línea continua) del peso molecular medido contra el peso molecular teórico de las muestras REF.End para todos los mutantes. También se muestra el intervalo de confianza del 95 por ciento para el ajuste (línea punteada). El punto en la parte superior izquierda muestra MYC 130. Los puntos dentro de las líneas punteadas están dentro del intervalo de confianza del 95 por ciento, y por consiguiente, no son significativamente diferentes de aquéllos del tipo silvestre. Los puntos debajo de las líneas punteadas representan los mutantes con un peso molecular promedio más bajo que el predicho, y los puntos arriba de ambas líneas punteadas representan los mutantes en donde se midió un peso molecular promedio más alto que el predicho.

La Figura 21 muestra los cromatogramas de SEC-HPLC (formulación) para las muestras REF.END de 119, Myc 106-origami, Myc 123 de tipo silvestre, y Myc 137 después de UFDF contra regulador de Tris 50mM, pH de 9.0. Las muestras se tomaron después de cada reconstitución del volumen. Muestra antes del tratamiento con UFDF (5), después del primer paso de intercambio de regulador (2), del segundo paso de intercambio de regulador (3), del tercero (4), y del último paso (5).

La Figura 22 muestra los cromatogramas de RP-HPLC 2 de las

muestras REF.IM, REF.3T y REF.END para todos los mutantes probados.

Breve Descripción de los Listados de Secuencias

SEQ ID NO:1 es Myc123.

SEQ ID NO:2 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:3 es Myc102, *Mycograb*-6H-TAA.

SEQ ID NO:4 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:3.

SEQ ID NO:5 es Myc101, *Mycograb*-TAA.

SEQ ID NO:6 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO:7 es MycC29X-TAA, por ejemplo,: Myc105, MycC29Y-TAA.

SEQ ID NO:8 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:7.

SEQ ID NO:9 es MycC29X-6H-TAA, por ejemplo: Myc106, MycC29Y-6H-TAA, Myc113, MycoC29S-6H-TAA.

SEQ ID NO:10 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:9.

SEQ ID NO:11 es Myc107, Myco-4-TAA

SEQ ID NO:12 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:11.

SEQ ID NO:13 es MycoC29X-4-TAA, por ejemplo: Myc108, MycoC29Y-4-TAA; Myc114, MycoC29S-4-TAA.

SEQ ID NO:14 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:13.

SEQ ID NO:15 es Myc109, N-Myco-4-TAA.

SEQ ID NO:16 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:15.

SEQ ID NO:17 es N-MycoC29X-4-TAA, por ejemplo: Myc110, N-MycoC29Y-4-TAA.

SEQ ID NO:18 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:17.

SEQ ID NO:19 es Myc111, N-Myco-6H-TAA.

SEQ ID NO:20 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:19.

SEQ ID NO:21 es N-MycoC29X-6H-TAA, por ejemplo: Myc112, N-MycoC29Y-6H-TAA.

SEQ ID NO:22 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:21.

SEQ ID NO:23 es Myc115, MycYSSS.

SEQ ID NO:24 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:23.

SEQ ID NO:25 es Myc116, MycYSIQSS.

SEQ ID NO:26 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:25.

SEQ ID NO:27 es Myc117, MycSIQKS.

SEQ ID NO:28 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:27.

SEQ ID NO:29 es Myc118, VH-2Bam-2VL.

SEQ ID NO:30 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:29.

SEQ ID NO:31 es Myc119, VL-2Bam-2VH.

SEQ ID NO:32 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:31.

SEQ ID NO:33 es Myc145, MycC98X-6H-TAA.

SEQ ID NO:34 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:33.

SEQ ID NO:35 es Myc129 (MycYSRIQSS).

SEQ ID NO:36 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:35.

SEQ ID NO:37 es Myc130 (MycYSRSIQSSKS).

SEQ ID NO:38 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:37.

SEQ ID NO:39 es Myc133.

SEQ ID NO:40 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:39.

SEQ ID NO:41 es Myc134.

SEQ ID NO:42 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:41.

SEQ ID NO:43 es Myc135.

SEQ ID NO:44 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:43.

SEQ ID NO:45 es Myc136.

SEQ ID NO:46 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:45.

SEQ ID NO:47 es Myc137.

SEQ ID NO:48 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:47.

SEQ ID NO:49 es Myc138.

SEQ ID NO:50 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:49.

SEQ ID NO:51 es Myc139.

SEQ ID NO:52 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:51

SEQ ID NO:53 es Myc140

SEQ ID NO:54 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:53.

SEQ ID NO:55 es Myc141.

SEQ ID NO:56 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:55

SEQ ID NO:57 es Myc142

SEQ ID NO:58 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:57.

SEQ ID NO:59 es Myc143.

SEQ ID NO:60 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:59.

SEQ ID NO:61 es Myc144.

SEQ ID NO:62 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID

NO:61.

SEQ ID NO:63 es la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del péptido scFv de Myc123 de tipo silvestre.

SEQ ID NO:64 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:63.

SEQ ID NO:65 es la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del péptido scFv de Myc123 de tipo silvestre.

SEQ ID NO:66 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:65.

SEQ ID NO:67 es la secuencia de nucleótidos de la secuencia de señal pelB.

SEQ ID NO:68 es la secuencia del péptido codificado por la SEQ ID NO:67.

SEQ ID NO:69 es el epítopo de hsp90 Candidal para el que es específico el péptido scFv de la SEQ ID NO:2 (*Mycograb*).

SEQ ID NO:70 es el epítopo de un péptido mezclado utilizado en el ensayo de enlace del Ejemplo 2.

Experimental

Ejemplo 1

Las células huésped de *E. coli* se transforman con el vector de expresión, y se cultivan en un cultivo sub-mers. A una OD600 adecuada, se induce la expresión del scFv mediante la desrepresión o activación del promotor inducible (es decir, promotor tac, trc, ó T7-lac). Esta inducción conduce a la acumulación de scFv en la célula

huésped, dando como resultado la producción de cuerpos de inclusión insolubles principalmente hechos de scFv acumulado. Después de un período de expresión adecuado, las células se cosechan mediante centrifugación, y se alteran. Subsiguientemente se aíslan los cuerpos de inclusión insolubles por medios gravimétricos.

Las secuencias de ADN estipuladas en las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59 ó 61 se insertan en un vector de expresión adecuado para *E. coli* (es decir, PET). La proteína se expresa en un huésped de *Escherichia coli*, y luego se purifica mediante cromatografía por afinidad. Se emplean los protocolos de biología molecular convencionales (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *supra*; Sambrook, J. y colaboradores, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Sambrook, J. y Russell, D., 200 1, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).

Después de la expresión intracelular, los péptidos scFv se acumulan en la forma de cuerpos de inclusión dentro de las células de *E. coli*. Para la purificación, los cuerpos de inclusión se aíslan, y el producto se extrae mediante solubilización y repliegue. La purificación hasta una pureza mayor del 95 por ciento se logra mediante cromatografía de intercambio de iones, y mediante cromatografía por afinidad con metal inmovilizado (IMAC).

Ejemplo 2 - Ensayo de Actividad ELISA

1. Sumario.

Se detectó la actividad de enlace de MYC123 (*Mycograb* "de tipo silvestre") y de los péptidos *Mycograb* mutantes, en un ELISA, utilizando el epítopo peptídico de hsp90 como antígeno. *Mycograb* o el *Mycograb* mutante llegó a enlazarse con el péptido biotinilado, el cual a su vez se enlazó con las placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Se utilizó un péptido mezclado como una secuencia de control. La detección se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-His conjugado con peroxidasa, el cual se enlaza con la región His de la proteína MYC123. La peroxidasa reaccionó con el sustrato de ABTS para producir una sustancia verde, cuya absorción se midió a 405 nanómetros. La absorción a 405 nanómetros es proporcional a la actividad del MYC123 en la solución. La actividad se determinó a partir de la curva de calibración de seis puntos para un estándar de referencia, y se indicó como el porcentaje de actividad, comparándose con la referencia.

El principio del ELISA se ilustra en la Figura 2, en donde se recubre una placa con estreptavidina 1, y se enlaza con la biotina 2. A su vez, la biotina 2 se enlaza con el péptido Hsp90 3, el cual se localiza en el sitio de enlace de Hsp90 4 del péptido scFv 5 de MYC123. El péptido scFv 5 tiene una marca His 6, con la que llega a enlazarse el anticuerpo de detección anti-His-peroxidasa 7.

2. Principio y Fuente del Procedimiento.

El ELISA utilizado fue un ensayo de detección directa, en donde se capturó el *Mycograb* o el *Mycograb* mutante, utilizando una microplaca superficial de estreptavidina recubierta con un péptido antigénico biotinilado (biotina- NKILKVIRKNIVKK - secuencia del epítopo a partir de Hsp90 candidal). Entonces se detectó la presencia de *Mycograb* o *Mycograb* mutante, utilizando un anticuerpo anti-marca His conjugado con peroxidasa de radícula roja. Entonces se agregó a los pozos ABTS, un sustrato para la peroxidasa de radícula roja, y la concentración de *Mycograb* presente fue proporcional a la absorbencia medida a 405 nanómetros. La actividad de las muestras de *Mycograb* o de *Mycograb* mutante se determinó directamente a partir de una curva estándar generada utilizando el material de referencia del producto de fármaco de *Mycograb* previamente existente.

3. Materiales.

3.1 Equipo

Las placas de microtitulación Streptawell High Band fueron suministradas por Roche (Catálogo Número 11989685001). Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un lector de microplacas Bio-Rad Modelo 680. El control del Hardware se llevó a cabo utilizando el Software Microplate Manager versión 5.2.1 (Bio-Rad, EUA). El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando Microsoft Excel.

3.2. Productos Químicos y Reactivos.

3.2.1 Productos Químicos.

Todos los productos químicos fueron de grado analítico, a menos

que se informe de otra manera.

Tris.....	Sigma T6791
Albúmina de suero bovino.....	Sigma A7030
Ácido Clorhídrico Concentrado.....	Sigma 32033-1
Tabletas de suero regulador con fosfato...	Sigma P4417
Tween 20.....	SigmaUltra P7949
Conjugado de anticuerpo Anti-marca His/HRP	Sigma A7958
ABTS.....	Sigma A3219
Biotina-NKILKVIRKNIVKK (SEQ. ID NO:69)	Pepceuticals, UK
Biotina- SFKWGVTTSLSYFPK (SEQ. ID NO:70)	Pepceuticals, UK

Agua, Milli-Q agua18.2MΩfiltrada, tamaño de poros 0.22 micras.

3.2.2 Reactivos.

Suministro de regulador de bloqueo 1 (albúmina de suero bovino al 5 por ciento en peso/volumen en agua Milli-Q).

Albúmina de suero bovino.....2.5 gramos.

Se pesan 2.5 gramos de albúmina de suero bovino, y se agregan a 50 mililitros de agua Milli-Q. Se almacenan a 4°C durante una semana.

Regulador Tris 1M, pH de 7.8.

Tris..... 121.24 gramos.

Se pesan 121.24 gramos de Tris, y se disuelven en 950 mililitros de agua MilliQ con agitación. El pH se verifica y se ajusta con la adición por goteo de ácido clorhídrico concentrado hasta un pH de 7.8. Se rellena hasta 1 litro con agua MilliQ. Se filtra a través de un filtro de 0.22 micras (Sartorius), y se almacena a temperatura

ambiente durante hasta un mes.

Regulador de dilución de muestras (Tris 20 mM, pH de 7.8, albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento en peso/volumen).

Se agregó 1 mililitro de solución de suministro de Tris 1M a 48 mililitros de agua MilliQ y 1 mililitro de una solución de Suministro de Regulador de Bloqueo 1. Se hace fresca para cada experimento.

Regulador de lavado (suero regulado con fosfato + Tween al 0.1 por ciento por volumen/volumen).

Se disuelven 5 tabletas de suero regulado con fosfato en 900 mililitros de agua MilliQ, se agrega 1 mililitro de Tween 20, se agita hasta que se disuelvan las tabletas, y se rellena hasta 1,000 mililitros con agua MilliQ. Se almacena a 4°C durante hasta una semana.

Suministro de Regulador de Bloqueo 2 (Regulador de Lavado + albúmina de suero bovino al 5 por ciento en peso/volumen).

Albúmina de suero bovino ..... 2.5 gramos.

Se pesan 2.5 gramos de albúmina de suero bovino, y se disuelven en 50 mililitros de Regulador de Lavado. Se almacenan a 4°C durante una semana.

Regulador de Dilución de Péptidos (suero regulado con fosfato + Tween 20 al 0.1 por ciento por volumen/volumen + albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento en peso/volumen).

Se agregó 1 mililitro de suministro de Regulador de Bloque 2 a 49 mililitros de Regulador de Lavado. Se hace fresco para cada experimento.

Solución de péptido antigénico.

Péptido de biotina-NKILKVIRKNIVKK ..... 10 miligramos.

Se hizo una solución de 2 miligramos/mililitro de la solución de péptido antigénico sintetizada a la medida, pesando 10 miligramos de péptido, y disolviéndolo en 5 mililitros de agua MilliQ. Se dosificaron alícuotas de 50 a 100 microlitros en tubos Eppendorf de 1.5 mililitros, y se almacenaron a -80°C durante hasta un año.

Solución de procesamiento de péptido antigénico (4 micrógramos/mililitro de péptido en regulador de dilución de péptidos).

Se agregaron 25 microlitros de solución de péptido antigénico (2 miligramos/mililitro) a 12.475 mililitros de Regulador de Dilución de Péptidos, para dar una solución de 4 micrógramos/mililitro. Se hace fresco para cada experimento.

3.2.3 Preparación de Muestras.

Artículo de Control.

Se volvieron a suspender 1x10 miligramos del lote de referencia de *Mycograb* (BN270603) en 5 mililitros de agua MilliQ, se mezclaron suavemente para asegurar que se incorporara y se disolviera todo el polvo en el frasco. Se centrifuga a 13,000 revoluciones por minuto durante 5 minutos para remover cualquier materia en partículas. Entonces se determina la concentración de proteína de esta solución de acuerdo con el procedimiento de concentración de proteína UV estándar.

Artículo de Prueba.

Se vuelven a suspender 1x10 miligramos del material de prueba de *Mycograb* o de *Mycograb* mutante, en 5 mililitros de agua MilliQ, y se procesan en una forma idéntica a la del Artículo de Control.

Estándares de Curva de Calibración.

El material del Artículo de Control se diluyó en el regulador de dilución de muestras para dar 5 mililitros de una muestra con una concentración superior de 5 microgramos/mililitro. Luego se utilizó esta solución para generar muestras diluidas en serie dobles, cada una en un volumen final de 2 mililitros, sobre un intervalo de concentración de 5 a 0.156 microgramos/mililitro.

4. Procedimiento.

1. Se removió una alícuota de la solución de suministro de 1 miligramos/mililitro de péptido antigénico del congelador, y se diluyó a 1:500 (25 microlitros de péptido en 12.5 mililitros de regulador), con regulador de suero regulado con fosfato conteniendo albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento (peso/volumen) y Tween 20 al 0.1 por ciento (volumen/volumen), para generar una solución de procesamiento de 4 microgramos/mililitro de péptido. Una placa High Bind StretaWell de 96 pozos (Roche) se recubrió desde las filas B-H con 100 microlitros de 4 microgramos/mililitro de péptido de biotina-NKILKVIRKNIVKK en albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento (peso/volumen), suero regulado con fosfato - Tween 20 al 0.1 por ciento (volumen/volumen). Se agregaron 100 microlitros por pozo de

albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento (peso/volumen), suero regulado con fosfato - Tween 20 al 0.1 por ciento (volumen/volumen) a todos los pozos de la Fila A. Luego se almacenó la placa durante la noche a 4°C.

2. Los pozos de la placa se lavaron entonces tres veces durante 30 segundos con 200 microlitros de regulador de suero regulado con fosfato - Tween 20 al 0.1 por ciento (volumen/volumen) en un Thermo WellWash AC.

3. Se prepararon las muestras de *Mycograb* y *Mycograb* mutante antes de cargarse, diluyendo hasta 5 microgramos/mililitro en regulador de Tris 20 mM, pH de 7.8, albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento (peso/volumen), a partir de la solución de suministro del frasco de *Mycograb* resuspendido. Entonces se prepararon las muestras de Mycograb® a partir de esta solución inicial de 5 microgramos/mililitro, mediante dilución en serie dos veces bajando hasta 0.15625 microgramos/mililitro con regulador de Tris 20mM, pH de 7.8, albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento (peso/volumen). Todas las diluciones individuales se llevaron a cabo ya sea en tubos Eppendorf de 1.5 mililitros (VWR, Catálogo Número 211-2139), o bien en recipientes Bijoux de 7 mililitros (VWR, Catálogo Número 215-0328), dependiendo de la cantidad requerida para el experimento. Entonces se cargaron 100 microlitros de cada muestra de dilución sobre la placa por triplicado. También se incluyó un conjunto de control de pozos testigos conteniendo 100 microlitros de Tris 20 mM, pH de 7.8, albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento

(peso/volumen) en la Fila H.

4. La placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, y entonces los pozos se lavaron tres veces con suero regulado con fosfato - Tween 20 al 0.1 por ciento (volumen/volumen), como se describe en el paso 2.

5. Se cargaron 100 microlitros de conjugado de anticuerpo monoclonal de ratón anti-His/HRP (Sigma A7058) en cada pozo, en una concentración de 1:2000, en albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento (peso/volumen), suero regulado con fosfato - Tween 20 al 0.1 por ciento (volumen/volumen), y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente.

6. Luego los pozos se lavaron como se describe anteriormente, y se detectó el *Mycograb*® enlazado mediante la adición de 100 microlitros de reactivo ABTS®. El revelado colorimétrico se leyó a 405 nanómetros, tomándose las lecturas cuando la absorbencia de las muestras de concentración más alta en la segunda curva de calibración alcanzó 1.3 AU. La concentración de *Mycograb*® fue proporcional a la absorción a una A405 nanómetros.

7. Los resultados de absorbencia A405 nanómetros para el material de referencia se transfirieron a una hoja de cálculo de Excel, y se graficó la función de calibración de segundo orden de 6 puntos $y = a + bx + cx^2$ a partir de la muestra de referencia de A405 nanómetros menos el control contra la concentración del *Mycograb*® en microgramos/mililitro, con un coeficiente de correlación de ≥ 0.99. Si existía un efecto de "gancho" observado, se removía el punto de

concentración más alta de la gráfica, dejando una curva de calibración de 5 puntos. Se removieron dos hileras individuales de pozos (determinado visualmente) por placa del análisis de los datos bajo algunas circunstancias, en el entendido de que no hubiera más de una hilera por medición triplicada. El porcentaje de actividad de calculó utilizando el análisis de regresión no lineal para calcular las concentraciones aparentes en las muestras, utilizando el medio de absorbencia apropiado.

Los resultados de ELISA obtenidos durante el estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Información de Muestras				**Datos del bioensayo**	
No.	**Muestra**	**Información de muestra**	**Composición del regulador**	**ELISA Sitio 1 [%]**	**ELISA Sitio 2 [%]**
1	MYC123 WT DF.R	Tipo silvestre	Tris 50 mM, pH de 9.0	71	95
2	DP (#140602)	Tipo silvestre	Urea 0.5 M, L-arginina 0.2M, pH de 9.5	90	78
3	MYC123 WT DOW.FT	Tipo silvestre	Tris 50 mM, sacarosa 1M, Tween 20 a aproximadamente el	135	130

193

Información de Muestras				Datos del bioensayo	
No.	**Muestra**	**Información de muestra**	**Composición del regulador**	**ELISA Sitio 1 [%]**	**ELISA Sitio 2 [%]**
			0.2%, DTT 3 mM, pH de 3.0		
4	MYC123 WT DOW.FT	Tipo silvestre	Tris 50 mM, DTT 3 mM, pH de 9.0	85	131
5	MYC C28Y DF.R	C28Y	Tris 50 mM, pH de 9.0	76	91
6	MYC C28Y DOW.FT	C28Y	Tris 50 mM, DTT 3.3 mM, pH de 9.0	79	98

Las muestras 1 y 3 a 6 son los intermediarios del proceso (no son sustancia de fármaco final) obtenidos después de la purificación previa de los cuerpos de inclusión, del repliegue, y de la remoción del detergente NLS (mediante cromatografía o diafiltración Dowex). La muestra 2 es un producto de fármaco de tipo silvestre original producido por Biomeva/Thymoorgan, y se utilizó en los estudios de la Fase III. La especificación para el producto de fármaco original fue del 75 al 125 por ciento del estándar de referencia. Todas las muestras se juzgaron como activas (enlace).

194

Ejemplo 3 - Determinación de la concentración inhibidora mínima de *Cryptococcus neoformans*

Sumario

En el ensayo de la concentración inhibidora mínima (MIC), se determinó la actividad antimicótica de MYC123, utilizando *Cryptococcus neoformans* como el organismo modelo. Este ensayo mide la actividad anti-fúngica, y puede imitar la acción de MYC123 en el establecimiento clínico.

La concentración inhibidora mínima (MIC) de MYC123 se determinó mediante micro-dilución en caldo, de acuerdo con el documento M27-A2 de National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Dicho de una manera breve: el medio RPMI se inoculó con 10^3 unidades formadoras de colonias/mililitro de *C. neoformans*. Se agregó MYC123 en concentraciones decrecientes al medio (1,024 microgramos/mililitro, 512 microgramos/mililitro, 256 microgramos/mililitro...). Las placas de la concentración inhibidora mínima se incubaron a 37°C durante 72 horas. Los puntos finales se determinaron como la concentración para producir pozos ópticamente transparentes (MIC-0), y la concentración que daba como resultado una disminución prominente en la turbidez (inhibición del crecimiento de ≥50 por ciento, MIC-2), comparándose con el control de crecimiento.

Método

Preparación antes del Ensayo

Gabinete de seguridad: Se inoculó una placa de SAB con *C.*

neoformans, y se incubó durante 48 a 72 horas a 35°C. La placa se selló parapelícula.

Banco:

Se preparó el RPMI. Se prepararon los agentes antifúngicos de acuerdo con la metodología de NCCLS (M27-A2) - total de 11 concentraciones en el medio de cultivo RPMI. Las concentraciones estuvieron en dos veces la concentración final requerida para la concentración inhibidora mínima individual.

Placa de Concentración Inhibidora Mínima (MIC)

En una placa de 96 pozos en forma de U - se agregaron 100 microlitros de la concentración de fármaco más alta que se fuera a probar (dos veces la concentración requerida) al pozo 1 de las filas A y B (el ensayo se hizo por duplicado). Esto se repitió a través de las columnas de la placa con concentraciones descendientes, por ejemplo, el pozo 2 de la siguiente concentración de las filas A+B, el pozo 3 de la siguiente concentración de las filas A+B. El pozo 12 contenía solamente el medio de cultivo.

Gabinete de seguridad: Preparación del inóculo - suspensión directa de colonias. Se hizo una suspensión directa de colonias de *Cryptococcus neoformans* a partir de una placa de 48 a 76 horas de edad, en el medio RPMI. Esto se ajustó al estándar de MacFarlands 0.5 (aproximadamente de $1x10^6$ a $5x10^6$ unidades formadoras de colonias/mililitro). Se hizo una dilución de 2.50. Se hizo una dilución adicional de 1:20 (aproximadamente de $1x10^3$ a $5x10^3$ unidades formadoras de colonias/mililitro, dos veces el inóculo requerido).

Gabinete de seguridad: Inoculación de la placa. La placa se procesó desde el pozo 12 hasta el pozo 1. Esto evitó que se llevara adelante el fármaco. Se pasaron por pipeta 100 microlitros de suspensión de inóculo a cada pozo (inóculo final) de $0.5x10^3$ a $2.5x10^3$ unidades formadoras de colonias/mililitro). Las placas se sellaron con parapelícula.

Incubación

Las placas de la concentración inhibidora mínima (MIC) se incubaron a 37°C durante 72 horas. Para verificar el inóculo, la suspensión de inóculos se diluyó en serie, y se aplicaron 10 microlitros de las diluciones sobre una placa SAB, y se incubaron a 37°C durante 72 horas.

Resultados de la Lectura

Utilizando un espejo de lectura, se comparó el crecimiento con aquél del control "sin fármaco" (pozo 12), y se calificó el crecimiento como sigue:

0 - Ópticamente transparente.

1 - Ligeramente nebuloso.

2 - Disminución prominente en el crecimiento (aproximadamente el 50 por ciento).

3 - Ligera reducción en la turbidez.

4 - Ninguna reducción en la turbidez.

Los resultados de la concentración inhibidora mínima (MIC) obtenidos durante el estudio, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Información de Muestras				Datos del bioensayo
No.	**Muestra**	**Información de muestra**	**Composición del regulador**	**MIC25.02.2008/ 29.02.2008 [µg/ml]**
1	MYC123 WT DF.R	Tipo silvestre	Tris 50 mM, pH de 9.0	128
2	DP (#140602)	Tipo silvestre	Urea 0.5M, L-arginina 0.2M, pH de 9.5	64
3	MYC123 WT DOW.FT	Tipo silvestre	Tris 50 mM, sacarosa 1M, Tween 20 a aproximadamente el 0.2%, DTT 3 mM, pH de 3.0	16
4	MYC123 WT DOW.FT	Tipo silvestre	Tris 50 mM, DTT 3 mM, pH de 9.0	64
5	MYC C28Y DF.R	C28Y	Tris 50 mM, pH de 9.0	64
6	MYC C28Y DOW.FT	C28Y	Tris 50 mM, DTT 3.3 mM, pH de 9.0	64
	Referencia		Urea 0.5M, L-arginina	128/64

Información de Muestras				Datos del bioensayo
No.	**Muestra**	**Información de muestra**	**Composición del regulador**	**MIC25.02.2008/ 29.02.2008 [µg/ml]**
	070602		0.2M, pH de 9.5	
	Regulador FB		Urea 0.5M, L-arginina 0.2M, pH de 9.5	512 ó 256
	Regulador Tris		Tris 50 mM, pH de 9.0	>512
	Regulador 6		Tris 50 mM, DTT 3 mM, sacarosa 1M, Tween 20 al 0.2%, pH de 3.0	16

Las muestras 1 y 3 a 6 fueron intermediarios del proceso (no las sustancias de fármaco finales) obtenidos después de la purificación previa de los cuerpos de inclusión, el repliegue, y la remoción del detergente NLS (mediante cromatografía o diafiltración Dowex). La muestra 2 fue un producto de fármaco de tipo silvestre original producido por Biomeva/Thymoorgan, y se utilizó en los estudios de la Fase III.

Los resultados de la concentración inhibidora mínima (MIC) obtenidos para las muestras, se compararon con los resultados

obtenidos para el regulador correspondiente. Todas las muestras se consideraron activas en comparación con la Referencia 070602, además de la muestra 3. La muestra 3 y el Regulador 6 dieron los mismos resultados, demostrando que el regulador sin MYC123 era tóxico para el organismo de prueba. Los valores para las muestras 1 y 4 a 6 estuvieron lejos de los valores para el Regulador de Tris, lo cual indica una mayor confiabilidad de los datos.

Ejemplo 4

Sumario

El objetivo de los mutantes de *Mycograb* fue obtener un péptido scFv mutante con mejores propiedades estructurales, comparándose con el *Mycograb* de tipo silvestre. Se creía que a través de las mutaciones puntuales, en especial el reemplazo de la cisteína libre por tirosina, se debería reducir la acumulación y la formación de enlaces de disulfuro incorrectos durante el procesamiento corriente abajo. También se creía que el intercambio de la orientación del fragmento de cadena pesada con el fragmento de cadena ligera, y la remoción de la marca-His, sería benéfica para la formación de una estructura tridimensional nativa de la molécula de *Mycograb*.

Después de la clonación, las construcciones se secuenciaron antes de la fermentación. La fermentación se escaló hacia arriba para suministrar suficiente material para el aislamiento del cuerpo de inclusión (IB) y para el procesamiento adicional corriente abajo. Las construcciones de expresión de los mutantes se purificaron de acuerdo con el proceso Biomeva adaptado, hasta el paso final de

repliegue.

Los parámetros físicos de un número de péptidos *Mycograb* mutante se probaron como se estipula en los Ejemplos 5 a 12.

En la Tabla 3 se da un panorama de los mutantes probados y sus mutaciones. Se incluyó el tipo silvestre en los estudios por razones de comparación.

Tabla 3

Nombre y propiedades estructurales de los 12 mutantes de *Mycograb* investigados, y el tipo silvestre (myc 123)

MUTANTE	Marca His	Longitud del enlazador	Alineación de VH-VL	Cisteínas	Mutaciones adicionales
MYC 188	NO	4X	VH N-terminal	5	
MYC 119	NO	4X	VL N-terminal	5	
MYC 130	NO	3X	VH N-terminal	4	C29Y, I30S, H69R, N86S, V139I, V140Q, F147S, F151S, A176K, N213S
MYC 133	NO	5X	VH N-terminal	5	
MYC 135	NO	5X	VL N-terminal	5	

MUTANTE	Marca His	Longitud del enlazador	Alineación de VH-VL	Cisteínas	Mutaciones adicionales
MYC 134	NO	6X	VH N-terminal	5	
MYC 137	NO	4X	VH N-terminal	4	C29Y, I30S
MYC 138	NO	5X	VH N-terminal	4	C29Y, I30S
MYC 106 origami	SÍ	3X	VH N-terminal	4	citoplasma oxidativo
MYC 136	NO	6X	VL N-terminal	5	
MYC 139	NO	6X	VH N-terminal	4	C29Y, I30S
MYC 123_tipo silvestre	SÍ	3X	VH N-terminal	5	
MYC 140	NO	4X	VL N-terminal	4	C29Y, I30S

Ahora se describirá la metodología empleada en los ensayos de prueba.

Aislamiento de cuerpo de inclusión (IB)

4 litros de caldo de fermentación obtenido en LVA (Laborversuchsanstalt) del cultivo del matraz de agitación de los Mutantes Myc 118,119,130,133 y Myc 135, se desintegraron con un

homogeneizador de alta presión (LAB 40-15 RBFI) en RPP4 a 700 Bar por dos ciclos de 15 minutos cada uno. Los cuerpos de inclusión se separaron del desecho celular a escala de laboratorio con un centrífugo de botella a 10,000 revoluciones por minuto durante 20 minutos a 4°C. Los cuerpos de inclusión se lavaron dos veces con agua para uso de laboratorio (WFL), y después, se preparó una suspensión al 20 por ciento (peso/volumen) en agua para uso de laboratorio. La suspensión se almacenó en alícuotas a -20°C.

Los cuerpos de inclusión de los mutantes Myc 134,137,138,106,136,139,140 y Myc 123 (tipo silvestre) se aislaron a escala piloto en RPP4 debido a que la fermentación de estos mutantes se hizo a una escala de 30 litros en biorreactores. Los cuerpos de inclusión se separaron del desecho celular con un centrífugo de pila de discos. Se preparó una suspensión al 20 por ciento (peso/volumen) en agua para inyecciones. Esta suspensión se almacenó en alícuotas a -20°C.

Solubilización

Solubilización con NLS (de acuerdo con el proceso Biomeva adaptado). La solubilización de la suspensión de cuerpos de inclusión al 20 por ciento se hizo mediante dilución con agua para uso de laboratorio, hasta una concentración de proteína de 8 miligramos/mililitro, seguida por una dilución de 1:2 con regulador de Tris 100 mM/Base, NLS al 4 por ciento, pH de 9.0. La solución se agitó a temperatura ambiente en un vaso de precipitados hasta la aclaración, pero cuando menos durante 30 minutos. Se registró el

tiempo al principio y al final de la aclaración.

Solubilización alternativa con urea, GuHCl, DTT. La estrategia de solubilización alternativa se llevó a cabo mediante una dilución de 1:10 de un volumen respectivo de suspensión de cuerpos de inclusión al 20 por ciento con Tris 20 mM, urea 8M +/- DTT 5 mM ó Tris 20 mM, GuHCl 6M +/- DTT 5M, ambos a un pH de 9.0. La concentración resultante de urea y GuHCl fue de 7.2M y de 5.2M, respectivamente, debido al volumen de la solución en suspensión de cuerpos de inclusión.

Repliegue de los cuerpos de inclusión solubilizados

Repliegue con NLS. El repliegue se hizo mediante una dilución de 1:4 de la solución de solubilización con un regulador de Tris 50 mM/Base. La concentración final de NLS fue del 0.5 por ciento. El repliegue se inició mediante la adición de $CuCl_2$ 50 µM. Las muestras se tomaron e inmediatamente se sometieron para el análisis RPC2 antes y después de la adición de $CuCl_2$, y luego aproximadamente 24, 48, 72, y 96 horas después de la adición de $CuCl_2$.

Repliegue después de la solubilización con urea, GuHCl. El repliegue de una solución de *Mycograb* después de la solubilización con urea 8M ó GuHCl 6M +/- DTT se llevó a cabo mediante una dilución de 1:50 con un regulador que contenía Tris 20 mM/Base, NLS al 1 por ciento, y cistina 2 mM a un pH de 9.0.

Para algunos mutantes, también se llevó a cabo la dilución de una solución de *Mycograb* después de la solubilización con urea a 1:10 con un regulador que contenía Tris 20 mM/Base, L-arginina

0.5M, y cistina 2 mM, a un pH de 9.0.

La solución de repliegue se agitó durante 96 horas a 4°C, o durante 24 horas a temperatura ambiente, respectivamente.

Cinética de repliegue

Se registró una cinética de repliegue para el Myc 119 mutante, con el objeto de determinar el tiempo de repliegue requerido. Una muestra de una suspensión de cuerpos de inclusión al 20 por ciento en Myc119 se solubilizó como se describe anteriormente. El repliegue se llevó a cabo como se describe en lo anterior, pero se tomaron muestras a los intervalos de tiempo respectivos, y se analizaron mediante RPC2.

Remoción de NLS mediante UF/DF a partir de la solución de repliegue. Los mutantes Myc119, Myc 137, Myc 106, y Myc 123 (tipo silvestre) se solubilizaron y se replegaron como se describe anteriormente. Después del repliegue, se llevó a cabo un intercambio de regulador de solución REF.END con una celda de agitación Amicon con un corte de peso molecular de 10 kDa. La concentración de NLS después de cada turno sobre el volumen se determinó con RP-HPLC. Se concentraron 50 mililitros de solución REF.END hasta 25 mililitros, y luego se rellenó nuevamente hasta 50 mililitros con regulador de diafiltración. Este procedimiento se llevó a cabo cuatro veces. Se midió la tendencia a la acumulación después de la remoción de NLS, con SEC-HPLC ejecutándose con el regulador de la formulación.

Análisis SDS-PAGE

El SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando geles NuPAGE 4-12 BisTris y MOPS como el regulador de ejecución. El tiempo de ejecución fue de 65 minutos a 200 voltios. Se aplicó una masa de 0.2 a 0.4 microgramos de *Mycograb* sobre cada pista. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con plata. Para la reducción de SDS-PAGE, se agregó DTT 100 mM a la muestra.

Resultados

La construcción de expresión de los mutantes se analizó en diferentes etapas en el procedimiento corriente abajo con los métodos analíticos enlistados en la Tabla 4:

Tabla 4

Código y descripción de los intermediarios del proceso y el ensayo analítico respectivo

CÓDIGO	Descripción del Intermediario	Método Analítico
IB RES	Resuspensión de cuerpos de inclusión (al 20 por ciento en peso/volumen)	RPC 1
IB SOL	Cuerpos de inclusión solubilizados	RPC 1, RPC 2
REF.IM	Intermediario de repliegue antes de la adición de $CuCl_2$	RPC 1,RPC 2

CÓDIGO	Descripción del Intermediario	Método Analítico
REF.END	Solución de repliegue, punto final	RPC 1, RPC 2, SEC NLS al 0.5%, SDS-PAGE, rojo/no rojo, Pep-map, SEC desnaturalizada

La Tabla 5 da una descripción de los métodos analíticos enlistados en la Tabla 4 que se utilizaron para la evaluación de los mutantes. Se incluye un comentario que se describe la especificidad del ensayo particular.

Tabla 5

Método analítico, la respuesta respectiva y la Unidad de Medición (UoM) para los ensayos empleados con el fin de evaluar las muestras mutantes

Método analítico	Respuesta	UoM	Comentario
RPC I	masa de proteína total	mg/ml	Este ensayo no es específico para la Muestra de *Mycograb* que se disuelve en SDS, DTT, y urea.

Método analítico	Respuesta	UoM	Comentario
RPC II	cromatograma	$t_{R\ (monómero)}$ [min]	El ensayo solamente se puede evaluar mediante una sobrepuesta de cromatogramas. El cambio del "pico monomérico" indica el repliegue.
SEC NLS al 0.5%	peso molecular promedio	kDa	Para las muestras que contienen NLS al 0.5%. La TR del máximo pico está correlacionada con el peso molecular. Pico de elución amplio de 43 a 900 kDa.
SDS-PAGE reductor	banda monomérica/-dimérica; contenido de impureza	banda	Los agregados no covalentes se disuelven mediante reducción; en comparación con el gel no reductor, evaluación semi-cuantitativa acerca del contenido de agregado posible.

Método analítico	Respuesta	UoM	Comentario
SDS-PAGE no reductor	bandas de monómero y agregado	banda	
Pep Map	puente de disulfuro	ninguna, débil, fuerte, y muy fuerte señal	La capacidad para detectar los péptidos depende de la sensibilidad del dispositivo de medición
SEC formulación	peso molecular promedio	kDa	Para muestras en una matriz similar a la del regulador de formulación. TR del máximo pico está correlacionado con el peso molecular.
RPC NLS	concentración de NLS	mg/ml	

Otros detalles de los ensayos respectivos para los mutantes investigados se resumen y se discuten en los siguientes Ejemplos 5 a 12.

Ejemplo 5 - Equilibrio de masa después de la solubilización y repliegue - resultados de la determinación de la titulación de RPC1

Se midió la concentración de proteína antes y después de la solubilización y del repliegue de los cuerpos de inclusión con el ensayo de titulación. Debido a que este ensayo mide toda la proteína soluble presente en la muestra, el equilibrio de masa debe producir el 100 por ciento. El equilibrio de masa para la solubilización se calculó utilizando el ecuación 1.

$$\% \; Sol = \frac{mg_{RPC1}\,\text{IB.SOL}}{mg_{RPC1}\,\text{IB.RES}}$$

Ecuación 1

en donde mg_{RPC1} *IB.SOL* es la masa de proteína en la solución de solubilización de los cuerpos de inclusión, calculada a partir de la medición de concentración mediante el método RPC1, y el volumen de la solución IB SOL. mg_{RPC1} *IB.RES* es la masa en la suspensión de cuerpos de inclusión al 20 por ciento, calculada a partir de la medición de la concentración mediante el método RPC 1, y el volumen de la solución después de la resuspensión de los cuerpos de inclusión aislados en DI.

El equilibrio de masa para el repliegue se calculó utilizando la ecuación 2, y se expresa como el porcentaje de recuperación. Los cuerpos de inclusión solubilizados con NLS al 4 por ciento, urea 8M +/- DTT 5 mM, o bien GuHCl 6M +/- DTT 5 mM, se diluyeron y se replegaron como se describe en 3.3.1 y 3.3.2, respectivamente.

$$\% \text{ Ref} = \frac{mg_{RPC1}\text{Ref.END}}{mg_{RPC1}\text{IB.SOL}}$$

Ecuación 2

en donde mg_{RPC1} REF.End es la masa de proteína de acuerdo con la medición de concentración con la RP-HPLC, encontrada en la solución de repliegue, por el volumen de solución de repliegue. mg_{RPC1} IB.SOL es la masa de proteína encontrada en el solubilizado de cuerpos de inclusión; % REF es la recuperación después del repliegue.

El equilibrio de masa después de la solubilización con NLS al 4 por ciento, y el subsiguiente repliegue de todos los mutantes, calculado mediante las ecuaciones 1 y 2, se ilustran en la Figura 3. Los datos brutos se pueden encontrar en las Tablas 6 y 7.

La Tabla 6 muestra la recuperación después de la solubilización con NLS de la suspensión IB_RES, y la recuperación después del repliegue, calculada a partir del método analítico RPC 1 para todos los mutantes probados. También se muestra la concentración de proteína en la solución IB-RES, y la concentración de proteína en la solución de repliegue, determinada mediante el método analítico RPC 1. La Tabla 7 muestra la concentración de proteína determinada mediante RPC 1 de las muestras IB_RES, IB_SOL, y REF.END, después de la solubilización con urea (SOL:urea) y de la solubilización con GuHCl (SOL:GuHCl). El tiempo de repliegue fue de 96 horas a 4°C. El factor de dilución fue de 500 y 50 para IB_RES e IB_SOL, respectivamente, para proporcionar la

212

solución REF.END.

Tabla 6

Mutante #	c [mg/ml] IB_RES	Solubilización de recupera-ción (%)	c [mg/ml] ref.end	Repliegue de recuperación (%)
MYC 138	27.2	110	1.18	72
MYC 123 tipo silvestre	54.9	138.75	1.65	99.2
MYC 140	18.7	105.55	1.46	82.8
MYC 137	19.2	150.25	1.83	83.7
MYC 139	19.9	138.66	1.82	84.2
MYC 119	13.6	152.27	1.59	84.84
MYC 118	19.8	136.1	1.77	89.8
MYC 136	15.1	141.5	1.76	90.1
MYC 133	16.3	117.175	2.09	94.1
MYC 135	11	135.65	1.82	96.3
MYC 134	35.9	77.35	2.73	99.1
MYC 106	13.7	124.75	2.95	87.1

Mutante #	c [mg/ml] IB_RES	Solubilización de recupera-ción (%)	c [mg/ml] ref.end	Repliegue de recuperación (%)
MYC 130	19.4	87	1.84	92.9

Tabla 7

			SOL:urea	SOL:GuHCl
Mutante #	**c IB_RES**	**c IB_SOL**	**c REF.end**	**c REF.end**
MYC 118	19.8	2	0.091	0.075
MYC 119	13.6	3.46	0.07	0.056
MYC 130	19.4	2.94	0.044	0.026
MYC 133	16.3	1.34	0.023	0.0193
MYC 135	11	1.41	0.035	0.042

El equilibrio de masa de la solubilización excedió al 100 por ciento para 10 de los 12 mutantes investigados. Esto podría deberse al hecho de que la suspensión de cuerpos de inclusión fue un tipo de muestra cruda, y eventualmente, los cuerpos de inclusión no se disolvieron completamente cuando se tomó la muestra, conduciendo

office

De: Angela Mateo [AMC@elzaburu.es]
Enviado el: Martes, 20 de Octubre de 2009 09:33 a.m.
Para: catalina.barbastefano@olarteraisbeck.com
CC: juan.moure@olarteraisbeck.com
Asunto: UNION EUROPEA. AGP AMERICA, S.A.- 1. Oposición contra la solicitud de marca comunitaria núm. 006733281 AGP VARIO PLUS (mixta) en clase 12. 2. Posible acuerdo de coexistencia con DAIMLER AG. (N/ Ref: CAR/B-1869/CE-20080173)

Correo enviado en nombre de Cristina Arroyo Meneses

Re: UNION EUROPEA. AGP AMERICA, S.A.- 1. Oposición contra la solicitud de marca comunitaria núm. 006733281 AGP VARIO PLUS (mixta) en clase 12. 2. Posible acuerdo de coexistencia con DAIMLER AG. (N/ Ref: CAR/B-1869/CE-20080173)

Estimada Sra. Barbastefano :

Acusamos recibo de su correo electrónico del pasado 2 de Octubre de 2009 y tomamos nota de su contenido.

Antes de que procedan con la firma del documento, vamos a prepararlo en inglés y en español, pues debe ser remitido a DAIMLER AG. también en este idioma, y se lo enviaremos a Vdes. para que revisen finalmente las dos versiones.

Si están conformes, daremos traslado del mismo a los representantes legales de DAIMLER AG. para su revisión y si la otra parte también está de acuerdo, les pediremos las firmas del documento por duplicado.

Tan pronto como se firme el documento, procederemos a la presentación de un escrito ante la OAMI solicitando la limitación del enunciado de productos afectado, y la retirada de la oposición por parte del oponente, para dar así cumplimiento de lo acordado en el acuerdo.

Volveremos a ponernos en contacto con Vdes. a la mayor brevedad.

Entretanto les enviamos un saludo,

Cristina Arroyo
car@elzaburu.es

ELZABURU
Estab 1865
Abogados y Agentes P. Industrial e Intelectual
Miguel Angel 21
28010 Madrid (Spain)

Tel.: +34 91 700 9400 / Fax: +34 91 319 3810
www.elzaburu.es

95

ELZABURU apoya la protección del medio ambiente. Antes de imprimir este correo electrónico piense si es necesario hacerlo.

Este correo electrónico, así como cualquiera de sus anexos, contiene información confidencial de ELZABURU. Su contenido es para uso exclusivo de sus destinatarios, por lo que queda prohibida la difusión, copia o utilización de dicha información por terceros. Si usted lo recibiera por error, por favor, notifíquelo al remitente y destruya el mensaje con todas sus copias.
This message, its content and any document attached thereto is for the exclusive use of its intended recipients and contains privileged, proprietary, or otherwise private information of ELZABURU. Therefore any disclosure, copying or use by third parties of this information is prohibited. If you receive this in error please notify the sender and delete the message.

a una solución no homogénea, y por lo tanto, subestimando la concentración total de proteína. La variabilidad de los datos es alta, con una desviación estándar relativa para seis mutantes analizados dos veces, en el intervalo del 2.6 por ciento (Myc 138) al 42.9 por ciento (Myc 133).

El porcentaje de recuperación después del repliegue fue de entre el 72 por ciento (Myc 138) y el 99 por ciento (Myc 134). La recuperación esperada es del 100 por ciento (similar a la recuperación después de la solubilización. Las recuperaciones después del repliegue fueron todas más bajas que el 100 por ciento, y la dispersión no fue tanto para la recuperación después de la solubilización. Esto indica que la estimación de la concentración de proteína en las muestras IB.SOL y REF.end es más precisa que en las muestras IB.RES. Sin embargo, el cálculo de la recuperación sirve primordialmente como un control para los experimentos de solubilización y repliegue.

En la Figura 4 se muestran las producciones de repliegue relacionadas con la solución de solubilización IB.SOL y la suspensión de cuerpos de inclusión IB.RES, cuando se utilizó urea 8M ó GuHCl 6M como el agente de solubilización.

La recuperación varía desde el 44 por ciento hasta el 230 por ciento, reflejando los problemas con la medición de la concentración de proteína, especialmente en las muestras IB.SOL e IB.RES, posiblemente debido a una homogeneización insuficiente antes del muestreo.

La concentración en las muestras REF.END después de la solubilización con urea fue comparable a la concentración en REF.END después de la solubilización con GuHCl (véanse las Tablas 6 y 7), aunque por un factor promedio de 1.2 más alto. Por lo tanto, la dilución fue consistente.

Ejemplo 6 - Tiempo de Solubilización

Se estudió el tiempo de solubilización con NLS para todos los mutantes. Se pudo observar el tiempo hasta que la solución empezó a hacerse transparente, y el tiempo hasta que ya no hubo más aclaración, y se registró como se ilustra en la Figura 5.

En contraste con la utilización de NLS al 2 por ciento, la solubilización con urea +/- DTT y GuHCl +/- DTT fue de dos a tres veces más rápida.

Se encontró una correlación entre el número de cisteínas y el tiempo requerido para la aclaración hasta el principio. Con la excepción del mutante 134 (5 cys), los mutantes con 4 residuos de cisteína se solubilizaron más rápido que los mutantes con 5 residuos de cisteína. La Figura 6 muestra un diagrama de variabilidad, en donde se grafica el principio (START) [minutos] de aclaración contra las tres categorías:

Alineación del fragmento de cadena pesada o ligera en el término N, número de elementos enlazadores, y residuos de cisteína. Con la excepción de Myc 134, indicado con 1 en la Figura 6, los puntos de datos en la categoría con cuatro cisteínas se dispersan alrededor más pronto que los tiempos de inicio de la solubilización,

que comparándose con los puntos de datos en la categoría con cinco cisteínas.

Un modelo de regresión (R^2 = 0.72 cuando se excluye Myc134) predijo que el principio de la solubilización disminuiría desde 20 minutos hasta 11.3 minutos para una construcción de *Mycograb* con cuatro cisteínas en lugar de 5 (no se muestra el modelo).

Ejemplo 7 - RPC 2 - repliegues de NLS

Muestras de *Mycograb* REF.END solubilizadas y replegadas de acuerdo con el proceso adaptado por Biomeva (descrito en el Ejemplo 4); los mutantes se analizaron mediante RPC 2.

En la Figura 7 y en la Figura 8 se muestra una sobrepuesta de muestras REF.END de todos los mutantes investigados, incluyendo el tipo silvestre (MYC 123). El mutante Myc 116 se rastreó más temprano en el DSP-DEV 1 de laboratorio, y se incluyó en la sobrepuesta por razones de comparación.

En la Figura 7, se muestran los cromatogramas de las muestras REF.END generadas a partir de los cuerpos de inclusión aislados a escala de bajo, y en la Figura 8 se muestran los cromatogramas de las muestras REF.END generadas a partir de los cuerpos de inclusión aislados a mayor escala en la planta piloto.

Se compararon los perfiles de elución con respecto a:

1. Tiempo de retención pico 1, que refleja la hidrofobicidad.
2. Muestra de pico 1, que refleja la presencia del dímero y la homogeneidad de la especie de monómero cuando el pico es agudo.
3. Proporción de área de monómero/dímero pico (pico 1) al

agregado/impureza pico (pico 2), que refleja el contenido de agregado/impureza.

Tiempo de retención pico 1, que refleja la hidrofobicidad

En la Tabla 8 se enlista el tiempo de retención del monómero/dímero pico para los mutantes probados.

Tabla 8

Tiempo de retención [minutos] del pico 1 en RPC 2 para los mutantes probados y las propiedades de las moléculas

Mutante	t_R [min]	Enlazador	Cisteína	Orientación de cadena
MMYC 130	Promedio: 8.16 n=3 RSD=4.6%	3X	4	VH
MYC 106 origami	9.8	3X	4	VH
MYC 138	9.99	5X	4	VH
MYC 139	10.035	6X	4	VH
MYC 123 tipo silvestre	10.041	3X	5	VH

Mutante	t_R [min]	Enlazador	Cisteína	Orientación de cadena
MYC118	10.075	4X	5	VH
MYC 137	10.116	4X	4	VH
MYC 134	10.26	6X	5	VH
MYC 140	10.526	4X	4	VL
MYC 119	10.535	4X	5	VL
MYC 135	10.558	5X	5	VL
MYC 136	10.637	6X	4	VL
MYC 133	10.659	5X	5	VH

El tiempo de retención varía mucho con la construcción de la molécula. No hay tendencia a que aumente el tiempo de retención (que refleja la hidrofobicidad) con la longitud del enlazador, como se esperaría. Un elemento enlazador consiste en cuatro glicinas y un residuo de serina. La glicina es hidrofóbica en contraste con la serina, que es hidrofílica. Sin embargo, el contenido de glicina cuatro veces más alto en el enlazador parece no aumentar de una manera significativa la hidrofobicidad, como se mide mediante el tiempo de retención en RPC 2.

El tiempo de retención de Myc 130 es más corto que para el resto de los mutantes. Diez aminoácidos fueron reemplazados por aminoácidos de una naturaleza más hidrofílica (cinco serinas), disminuyendo de esta manera la hidrofobicidad de la molécula, y en consecuencia, dando como resultado un tiempo de retención más corto. La exclusión de este punto de datos del análisis estadístico, da como resultado un modelo que muestra una diferencia significativa en el tiempo de retención cuando la orientación de la VL es N-terminal, comparándose con una orientación cuando es C-terminal. El tiempo de retención aumenta por 0.41 minutos cuando el elemento VL se localiza N-terminal, comparándose con cuando se localiza C-terminal. La Figura 9 muestra las estimaciones a escala y un perfilador de predicción del modelo con el número de cisteínas, la longitud del enlazador, y la orientación del fragmento de cadena, como factores, y el tiempo de retención como respuesta.

Observe que el tiempo de retención de Myc 130 se excluyó del modelo. Una gráfica del tiempo de retención contra la longitud del enlazador, mostrada en la Figura 10, demuestra que el tiempo de retención para esta construcción es más bajo comparándose con el resto de los mutantes, debido a que las mutaciones puntuales dan como resultado una naturaleza más hidrofílica, como se mencionó anteriormente.

Forma del pico 1

Se asume que un pico 1 agudo, sin protuberancias o solamente con pocas protuberancias, refleja la homogeneidad de un *Mycograb*

monomérico. La forma del pico se evaluó mediante sobrepuestas de los cromatogramas RPC 2 de las muestras REF.End de todos los mutantes, y se determinaron los picos más agudos para los mutantes Myc 137, Myc 138 y Myc 139. El pico 1 fue más agudo que el del Myc 123 de tipo silvestre, y los picos 1 y 2 estuvieron separados casi en la línea base. Esto puede ser una indicación de que estas construcciones expresan la proteína monomérica/dimérica con una mayor homogeneidad que el tipo silvestre.

Proporción de área de monómero/dímero pico

El contenido de impureza/agregado en relación con el monómero/dímero fue más bajo para Myc 116 y MYC123 de tipo silvestre, como se muestra en la Figura 7 (Myc 123 de tipo silvestre). Sin embargo, el análisis de estas dos muestras fue llevado a cabo tres meses antes por otro laboratorio, y se observó un aumento del pico 2 a través del tiempo. En la Figura 8 se muestra un cromatograma de la muestra REF.End de Myc 123 que se preparó y se analizó en el mismo mes que las muestras REF.End de los mutantes probados. La comparación del cromatograma de MYC123 mostrado en la Figura 7, con el mostrado en la Figura 8, conduce a la conclusión de que la preparación de muestras y el método analítico no son exactamente reproducibles.

La proporción de área del monómero/dímero pico al agregado pico se determinó normalizando el pico 1 hasta el mismo pico máximo. El área pico del pico 2 después de la normalización se clasificó de acuerdo con el tamaño creciente, utilizando una

estimación de área visual. El panorama normalizado se muestra en la Figura 11.

Se podría establecer la siguiente clasificación:

Myc 116, Myc 139, Myc 136 < Myc 119, Myc 12, Myc140 < Myc137, Myc 135, Myc138 < Myc106 < Myc130 < Myc 134 < Myc118 < Myc133

Los cromatogramas RPC 2 de las muestras REF.End a partir de los cuerpos de inclusión de los mutantes Myc 106, 134, 136-139 se procesaron en la planta piloto, y mostraron picos más bajos de impureza/agregado (véase la Figura 8) que los cuerpos de inclusión de los mutantes Myc 118-135 aislados a escala de banco.

Ejemplo 8 - RPC 2 -pliegues de urea/GuHCl

Los mutantes Myc 118, 119, 130 y Myc 133 se disolvieron con urea 7.6M +/- DTT, y GuHCl 5.6M +/- DTT, y se inició el repliegue mediante dilución en regulador de repliegue.

Ninguna de las muestras REF.End mostró el monómero/dímero pico (pico 1) en RPC 2. Es predominante un enorme pico 2, asumido como los agregados y las impurezas. En la Figura 12 se da un cromatograma de RP-HPLC representativo de una muestra de final de repliegue del mutante Myc 119. La muestra se preparó como se describe en el Ejemplo 4.

Se esperaba que el monómero se eluyera en aproximadamente 10.5 minutos. Los picos que se eluyen más pronto no se identifican, y no se observaron en los repliegues con NLS al 0.5 por ciento. El enorme pico 2 indica una fuerte acumulación. Se obtuvieron perfiles de elución similares para todas las muestras REF.End después de la

solubilización con urea/GuHCl.

Se obtuvieron perfiles de elución similares cuando se hizo el repliegue mediante dilución a 1:10 con un regulador que contenía Tris 20 mM/Base, L-arginina 0.5M, y cistina 2 mM, a un pH de 9.0. En la Figura 13 se muestra un cromatograma representativo.

La fuerte tendencia a la acumulación se confirmó mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, y se detectó una mancha de HMW enorme e intensa para una muestra REF.End, sin banda monomérica visible después de la solubilización con urea. Esta mancha desapareció luego cuando la muestra se redujo, y apareció una banda monomérica de *Mycograb*. En la Figura 14, se muestra un análisis SDS-PAGE de una muestra REF.End reducida y no reducida después de la solubilización con urea. Las pistas 4 a 7 muestran la muestra REF.IM y REF.End en MYC 119 bajo condiciones no reductoras a dos diluciones diferentes. Las muestras 10 a 13 muestran la misma muestra bajo condiciones reductoras. La mancha del agregado desapareció cuando se redujo la muestra, y a medida que se hizo visible la banda monomérica, así como la dimérica.

La urea y el GuHCl estuvieron presentes en la solución de repliegue en una baja concentración (0.14M en el caso de una dilución de 1:50, y 0.72M en el caso de una dilución de 1:10 para urea; para GuHCl, fue de 0.11M en el caso de una dilución de 1:50, y de 0.56M en el caso de una dilución de 1:10), y no se puede prevenir la acumulación de la proteína. La utilización de DTT no parece tener un efecto significativo sobre la acumulación, debido a que los

cromatogramas de RP-HPLC (RPC 2) con y sin DTT fueron comparables, como se muestra en la Figura 12.

En contraste con la muestra REF.End, el cromatograma RPC 2 de una muestra IB.SOL disuelta con urea, fue comparable en términos de la forma del pico con una muestra de IB.SOL disuelta en NLS al 2 por ciento. La Figura 15 muestra una sobrepuesta de los cromatogramas de HPLC.

El análisis de SDS-PAGE de una muestra IB.SOL no reducida mostró bandas de HMW más fuertes cuando se disolvió la muestra con urea, que en el caso de una muestra IB.SOL disuelta en NLS al 2 por ciento. Esto se muestra en la Figura 14: en la pista 3, la muestra se solubilizó con urea, y en la pista 8, la muestra se solubilizó con NLS al 2 por ciento. Se puede concluir que el pico 2 en la RP-HPLC no da una indicación acerca del contenido del agregado, debido a que el pico 2 de una sobrepuesta del cromatograma es todavía más pequeño para una muestra IB.SOL en urea que en NLS.

Posteriormente, el repliegue no produjo un pico monomérico, pero la proteína se acumula completamente.

Ejemplo 9 - SDS-PAGE reductor y no reductor

Se llevó a cabo el SDS-PAGE reductor y no reductor para determinar el contenido de impurezas y agregados en las muestras REF.End. Con el SDS-PAGE reductor, la especie de *Mycograb* apareció como la banda monomérica y dimérica, y se pudo distinguir el contenido de impureza de la célula huésped en la muestra a partir de las especies acumuladas, al compararse con un gel de SDS-PAGE

no reductor. El SDS-PAGE no reductor mostró monómeros de *Mycograb*, dímeros, y agregados. Comparando un gel teñido de plata de SDS-PAGE no reductor con un análisis SDS-PAGE reductor, se pudo evaluar la cantidad de las especies acumuladas de una manera cuantitativa. Los geles SDS-PAGE reductor y no reductor de las muestras REF.END de todos los mutantes probados se muestran en la Figura 16 y en la Figura 17.

El gel de la Figura 16, sobre el lado izquierdo, muestra un SDS-PAGE reductor de las muestras REF.End de los mutantes MYC 118, 119, 130, 133, 134, 135, 137. La banda a 30 kDa es *Mycograb* monomérico, y es predominante en todas las muestras. De acuerdo con la migración de la banda monomérica, el *Mycograb* expresado en MYC 134 mutante parece tener un peso molecular más alto que los otros mutantes analizados sobre el gel. Se detectó lo mismo pero hasta un menor grado para MYC 135. De acuerdo con la Tabla 9, MYC 134 tiene el peso molecular teórico más alto entre los mutantes mostrados en la Figura 16, seguido por MYC 135.

En el gen SDS-PAGE no reductor, son visibles las especies acumuladas, así como el dímero. En las pistas 13 (MYC 134) y 15 (MYC 137), las bandas de HMW están más desvanecidas que en las otras pistas. Esto indicaría un contenido más bajo de especies acumuladas; sin embargo, también las bandas para el monómero están más desvanecidas.

Se observaron bandas dobles de diferente tiempo de migración e intensidad unas en comparación con otras para todos los mutantes,

con la excepción de Myc 133 que se muestra en la Figura 16. la identificación de estas bandas fue difícilmente posible; sin embargo, se asumió que era el monómero *Mycograb* de la estructura de tipo nativa.

La Figura 17 muestra un SDS-PAGE reductor y no reductor de las muestras REF.End a partir de los mutantes MYC 106, 136,138,139,140 y el tipo silvestre, MYC 123. Las diferencias en el peso molecular para las diferentes construcciones se pudieron determinar de acuerdo con la diferente migración de la banda monomérica. Las bandas de las pistas 5 y 7 aparecieron a un peso molecular ligeramente más bajo que las bandas en las pistas 2,3,6, y 4, que estuvo de acuerdo con el peso molecular teórico enlistado en la Tabla 9.

La masa de proteína aplicada al gel no fue consistente; las bandas monoméricas variaron en intensidad, debido a que la determinación de la concentración de proteína en la muestra REF.End no fue suficientemente precisa. Por consiguiente, no fue posible el análisis semi-cuantitativo del contenido de impureza. Sin embargo, el contenido de impureza más alto en la muestra REF.End de Myc 106 fue obvio, debido a que el espesor de la banda monomérica fue comparable con una de Myc 140, pero la intensidad de las otras bandas fue mucho más alta.

El análisis SDS-PAGE indicó que la muestra REF.End de Myc $106_{origami}$ contenía más HCP e impurezas relacionadas con el producto. Sin embargo, esto no se confirmó mediante el método

analítico RPC2, en donde el área del pico 2 estuvo en el mismo intervalo que para los otros mutantes.

Ejemplo 10 - SEC NLS al 0.5 por ciento: determinación del peso molecular de las especies de *Mycograb* en la muestra REF.END

Todas las muestras REF.END preparadas de acuerdo con el proceso Biomeva adaptado (véase el Ejemplo 4) se analizaron con SEC-HPLC en NLS al 0.5 por ciento, y se determinó el peso molecular promedio. En la Figura 18 y en la Figura 19 se muestra una sobrepuesta de los cromatogramas de SEC.

El peso molecular promedio estuvo en el intervalo de 48.6 kDa a 65.8 kDa. La amplitud de los picos refleja la heterogeneidad de las especies en la muestra. Aunque aproximadamente el 80 por ciento del producto fue monomérico en las muestras REF.End, hubo dímeros y especies de peso molecular más alto presentes, así como impurezas no relacionadas con el producto, dando como resultado un pico de elución amplio.

En la Figura 18, sobresale el perfil de elución de Myc 130, debido al mayor frente, comparándose con las otras muestras investigadas. Esto podría haberse debido a la mayor heterogeneidad en la muestra, debido a la naturaleza de la construcción (más hidrofílica), o bien debido a un tratamiento de la muestra accidentalmente diferente.

Las muestras ilustradas en la Figura 18 se prepararon de una manera simultánea, y se almacenaron a 4°C durante 5 días antes del análisis. Las muestras ilustradas en la Figura 19 se prepararon de

una manera simultánea y se almacenaron a 4°C durante la noche antes del análisis. Las muestras parecieron ser estables a 4°C, debido a que el peso molecular de las construcciones estuvo en un intervalo similar.

El frente de Myc 130 puede haberse debido a una cantidad más alta de especies acumuladas, comparándose con las otras muestras investigadas. Sin embargo, el pico 2 en el cromatograma de RPC 2 correspondiente no fue sobresalientemente grande, pero se ha observado que sólo algunas veces hay una correlación entre el mayor peso molecular determinado mediante SEC NLS al 0.5 por ciento y el área pico de pico grande 2, determinada con RPC2.

Adicionalmente, el SDS-PAGE de Myc 130 no indicó un contenido de impureza más alto ni una mayor heterogeneidad de la muestra. Otros factores que conducen al frente en SEC, tales como sobrecarga de la columna y la mayor temperatura durante el análisis, se pueden excluir, debido a que todas las muestras se analizaron el mismo día.

Hubo un tiempo de retención muy temprano para Myc 130 en RPC2.

Se asumió que el peso molecular promedio en una muestra REF.End era creciente para una cantidad creciente de dímeros, agregados, e impurezas. El peso molecular calculado de un *Mycograb* monomérico expresado en diferentes mutantes fue de entre 26 y 27 kDa, debido a la diferente longitud del enlazador y a otras mutaciones. En la Tabla 9 se muestra una tabla que enlista el

peso molecular teórico - calculado a partir de los aminoácidos -, el peso molecular de la muestra REF.End determinada mediante SEC, el número de aminoácidos, la longitud del enlazador, y el número de cisteínas.

Tabla 9

Resultados de SEC-HPLC, NLS al 0.5 por ciento, de las muestras REF.End a partir de todos los mutantes probados. Los mutantes se clasifican de acuerdo con su peso molecular teórico

MUTANTE	Peso molecular teórico	SEC	# aa	Longitud del enlazador	Número de cisteínas
MYC 130	26.1	65.8	246	3X	4
MYC 118	26.4	48.6	251	4X	5
MYC 137	26.466	47.1	251	4X	4
MYC 119	26.5	49.9	252	4X	5
MYC 140	26.55	49.3	252	4X	4
MYC 133	26.7	57.9	256	5X	5
MYC 138	26.78	51.0	256	5X	4
MYC 135	26.8	52.2	257	5X	5
MYC 136	27.018	64.6	261	6X	5

MUTANTE	Peso molecular teórico	SEC	# aa	Longitud del enlazador	Número de cisteínas
MYC 134	27.062	62.6	261	6X	5
MYC 139	27.09	64.7	261	6X	4
MYC 123Wt	27.32	63.5	256	3X	5
MYC 106 origami	27.38	61.5	256	3X	4

El peso molecular teórico se graficó contra el peso molecular determinado mediante SEC, y se encontró una relación lineal con un coeficiente de correlación de 0.77 cuando se excluyó el punto de datos para Myc 130.

Los mutantes Myc 106, Myc 138 y Myc 135, representados por los puntos a la derecha de la línea punteada inferior en la Figura 20, tuvieron un peso molecular promedio más bajo que el tipo silvestre. Los mutantes Myc 133, 136, y 139, representados por los puntos a la izquierda de la línea punteada más alta, tuvieron un peso molecular promedio más alto que el tipo silvestre. Sin embargo, se tiene que tomar en cuenta la variabilidad del ensayo. Adicionalmente, a partir de la Figura 19, se puede ver que la masa de proteína inyectada no siempre fue la misma que el área pico para algunas de las muestras. La formación de agregados covalentes debe disminuir para los

mutantes con cuatro cisteínas, comparándose con *Mycograb* con cinco cisteínas, debido a que no está disponible una cisteína libre en los mutantes con cuatro cisteínas después de la formación de los puentes intermoleculares SS. Los agregados covalentes intermoleculares se forman durante el repliegue, inclusive con un mutante que tenga solamente cuatro cisteínas, pero posiblemente sería que la cantidad es más baja que para un mutante con cinco cisteínas.

Ejemplo 11 - Formulaciones de SEC: Remoción de NLS mediante UF/DF a partir de la solución de repliegue para medir la tendencia a la acumulación

Con el objeto de evaluar la tendencia a la acumulación de los mutantes *Mycograb*, se disminuyó la concentración de NLS por un factor promedio de cinco a partir de la solución REF.End contra ultra/diafiltración, utilizando una celda de agitación. El volumen de regulador total utilizado durante la diafiltración dividido entre el volumen del retentato, es el diafactor, y fue de 2.5.

La base de razonamiento de este experimento fue para investigar la tendencia a la acumulación de los mutantes cuando se disminuye el agente de disolución de NLS hasta una concentración en la cual no se puede impedir ya la acumulación.

Se asumió que se puede evaluar la formación de los agregados con la formulación de SEC-HPLC. El regulador de elución contuvo regulador de urea 0.5M, pero nada de NLS, para suprimir la acumulación.

El aumento en el peso molecular se utilizó como una medida de la tendencia a la acumulación, y permite que se comparen los mutantes.

Se seleccionaron los mutantes Myc 137, Myc 106, Myc 119, y el Myc 123 de tipo silvestre, para un primer conjunto de experimentos. La Tabla 10 muestra el peso molecular (MW) en kDa, determinado mediante SEC-HPLC ejecutándose en el regulador de formulación, y la concentración de NLS (%) se determinó mediante RP-HPLC para las muestras REF.End de los mutantes MYC 119,137,106 y MYC 123, antes y después de la UFDF. El factor de reducción de NLS se calculó a partir de la concentración de NLS en la muestra antes de la UFDF (#2) dividido entre la concentración de NLS después de la UFDF (#3). El porcentaje de incremento de peso molecular basado en la SE-HPLC, NLS al 0.5 por ciento, se calculó a partir del peso molecular de la muestra REF.END (#1), y el peso molecular después de la UFDF (#3) para el mutante respectivo.

Tabla 10

		MYC 123		MYC 119		$MYC106_{origami}$		MYC 137	
Muestra no.	**Código de muestra**	**MW [kDa]**	**c NLS %**	**MW [kDa]**	**c NLS %**	**MW [kDa]**	**c NLS %**	**MW [kDa]**	**c NLS %**
#1	REF. END*	63.5[**]	n.d	49.3 [**]	n.d	61.5 [kDa] **	n.d	47.1 [**]	n.d
#2	Antes de UFDF	214	0.52	359	0.58	202	0.607	212	0.57

		MYC 123		MYC 119		$MYC106_{origami}$		MYC 137	
Muestra no.	Código de muestra	MW [kDa]	c NLS %	MW [kDa]	c NLS %	MW [kDa]	c NLS %	MW [kDa]	c NLS %
#3	Después de UFDF	178	0.08	245	0.171	184	0.132	194	0.114
	Factor de reducción de NLS		6.5		3.4		4.6		5
	% de incremento de peso molecular basándose en*	180%		397%		199%		312%	

*El peso molecular se determinó con un método analítico de SEC HPLC conteniendo NLS al 0.5 por ciento en el regulador de ejecución (SEC HPLC, NLS al 0.5 por ciento).

**Datos de la Tabla 9.

El alto peso molecular aparente determinado mediante SEC HPLC (ejecutándose con el regulador de formulación) de la muestra antes de la UFDF se debió a la acumulación de la proteína durante el análisis.

La muestra antes de la UFDF todavía contenía NLS al 0.5 por ciento. Debido a que la muestra migró a través de la columna, el NLS se retardó más fuertemente que la proteína, y en consecuencia, se presentó la acumulación. Por consiguiente, este método analítico no fue adecuado para determinar el peso molecular de las muestras que contenían NLS.

Con el objeto de determinar el peso molecular de *Mycograb* en la muestra REF.End, se utilizó SEC HPLC con NLS al 0.5 por ciento en el regulador de ejecución. El incremento en el peso molecular después de la remoción del NLS en la muestra REF.End mediante la UFDF se calculó como se describe anteriormente en relación con la Tabla 10. Los valores se muestran en la fila 6 de la Tabla 10. MYC 123 mostró el incremento más pequeño en el peso molecular, mientras que MYC 119 tuvo el incremento más fuerte, del 400 por ciento.

Basándose en estos datos, MYC 123 tiene una tendencia a la acumulación más baja que MYC 119. Sin embargo, se tiene que considerar que la SEC HPLC analítica puede tener una influencia sobre la estructura de la proteína y sobre la formación de agregados. Más aún, el incremento del peso molecular se calcula a partir de los datos obtenidos de dos métodos analíticos diferentes, y no se puede evaluar si el peso molecular de una muestra es similar cuando se determina con los diferentes métodos.

En la Tabla 11, los mutantes se clasifican de acuerdo con el incremento en el peso molecular después de la remoción del NLS, junto con las mutaciones. Se tiene que observar que los dos mutantes con un elemento enlazador 3x tienen un porcentaje de incremento de peso molecular significativamente más bajo, comparándose con los mutantes con un elemento enlazador 4x.

Tabla 11

Incremento del peso molecular después de la remoción de NLS mediante UFDF para los cuatro mutantes investigados

MUTANTE	% de incremento de peso molecular	Marca His	Longitud del enlazador	Alineación VH-VL	Cisteínas
MYC 123 de tipo silvestre	180	SÍ	3x	VH N-terminal	5
$MYC106_{origami}$	199	SÍ	3x	VH N-terminal	4
MYC 137	312	NO	4x	VH N-terminal	4
MYC 119	397	NO	4x	VH N-terminal	5

La Figura 21 muestra una sobrepuesta de los cromatogramas de SEC HPLC obtenidos a partir de la muestra antes de la UFDF, y después de cada reconstitución del volumen. La muestra de los picos de elución no cambió de una manera significativa con la reducción de la concentración de NLS. En consecuencia, el peso molecular de la muestra también permaneció constante con la reducción de NLS. Esto podría ser una indicación de que existe un límite en la concentración de tensoactivo debajo del cual se inicia la acumulación, pero no procede adicionalmente. Sin embargo, el

impacto del método analítico sobre el peso molecular de la muestra no se conoce, y puede ser la razón por la cual todas las muestras tienen un peso molecular similar.

La concentración de NLS se redujo en promedio (n=5) hasta una concentración del 0.124 por ciento después de cinco reconstituciones del volumen, que corresponde a un diavolumen de 2.5. Teóricamente, para una retención R=0 de NLS, la concentración de NLS restante calculada debe ser del 0.020 por ciento. Se utilizó la ecuación 3 para el cálculo de la concentración de NLS restante teórica:

$$c_{retentato} = c_{alimentación} \, x \, (e^{(R-1)x^{[En\ VCF+N]}})$$

Ecuación 3

en donde $c_{retentato}$ es la concentración de NLS en el retentato, $c_{alimentación}$ es la concentración de NLS en la solución de alimentación. R es la retención, el factor de soluto que es retenido por la membrana. VCF es el factor de concentración de volumen, y N es el diavolumen, que es el volumen de regulador total introducido a la operación durante la diafiltración, dividido entre el volumen del retentato.

La discrepancia entre la concentración teórica y la concentración medida de NLS en el retentato es una indicación para la retención de NLS por la membrana mayor de 0. Esto podría deberse a la interacción entre NLS y la proteína, la membrana, y/u otros componentes. La capacidad para deformarse también puede causar una retención indeseada.

Ejemplo 12 - Análisis Pep-Map

Se analizaron las muestras REF.End de todos los mutantes para el puenteo de disulfuro con el mapa del péptido. Antes del análisis, la muestra se alquiló con yodo-acetamida, se digirió con tripsina, y se sometió NLS. Los tipos UV de los péptidos individuales se identificaron con espectrometría de masas. Los péptidos con los grupos SH libres, formaron correcta e incorrectamente enlaces S-S, así como se determinaron de una manera semi-cuantitativa los péptidos diméricos, siempre que fue posible.

Una construcción correctamente plegada con cinco cisteínas forma un enlace S-S entre Cys 23 y Cys 97, que corresponde a T3 y T9, respectivamente. El enlace de T3-T9 se localiza en la cadena ligera. El otro enlace de disulfuro está sobre la cadena pesada, entre Cys 159 y Cys 224, que corresponde a T12 y T17. La quinta cisteína está localizada en Cys 28, y corresponde al péptido T4.

Una construcción con cuatro cisteínas siempre carece del residuo Cys 28, y los puentes S-S correctos son similares que para la construcción con cinco cisteínas.

Los mutantes 118, 119, 130, 135, 133, 134, 137 y C28Y +HIS (106), así como C28Y-HIS (108), se analizaron en AL1 de laboratorio. Los mutantes 106 origami, 136, 138, 139, 140, y el 123 de tipo silvestre, se analizaron en AL2 de laboratorio analítico con un dispositivo diferente. La sensibilidad del espectrómetro de masas AL1 es más alta que aquélla en AL2, y por consiguiente, no se pudo obtener un análisis semi-cuantitativo de los mutantes analizados en

AL2. Sin embargo, fue posible determinar si estaban presentes los puentes SS correctamente formados.

En la Tabla 12 se da un resumen de los datos obtenidos. Los resultados están compilados en tres categorías: SH libre, cisteínas puenteadas, y cisteínas diméricas. Las cisteínas libres indican un grupo SH que no formó un enlace de disulfuro. Las cisteínas puenteadas son enlaces de disulfuro intramoleculares, y las cisteínas diméricas representan los disulfuros intermoleculares. W indica que se detectó una señal débil para el péptido respectivo, y X representa los péptidos que dan señales fuertes. Los mutantes analizados en AL2 están marcados con *.

Tabla 12

Análisis Pep-Map de todos los mutantes probados

		Mutantes con 5 cisteínas						Mutantes con 4 cisteínas							
		Myc 118	Myc 119	Myc 133	Myc 134	Myc 135	Myc 123*	Myc106* origami	Myc 130	Myc 137	Myc 138*	Myc 139*	Myc 140*	Myc 106 (C28Y+HIS)	Myc 108 (C28Y-HIS)
Cisteínas libres	SH libre en T4	W	W	W				no 741							
	Todas las otras SH libres	W	W	W	W	W	X								
Cisteínas puenteadas	**Disulfuros correctos**														
	T3-T9	W	W	W		W			X	X				X	X
	T12-T17	X	X	X						X				X	X
	Disulfuros incorrectos														
	Todas las otras combinaciones	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	W	X	X	X
Dímeros	T9-T9	X		W	W				X	W				W	W
	Otros dímeros						W								

Un *Mycograb* "correctamente" plegado con 5 cisteínas debe dar una señal significativa para la SH libre en el péptido T4, y ninguna señal correspondiente a otros grupos SH libres. Adicionalmente, se espera una señal fuerte para los disulfuros correctos T3-T9 y T12-T17, y no debe hacer enlaces SS incorrectos. Finalmente, no debe haber enlaces S-S intermoleculares presentes.

Un *Mycograb* "correctamente" plegado con cuatro cisteínas, no debe tener grupos SH libres. Solamente se deben detectar los enlaces S-S correctos T3-T9 y T12-T17. Adicionalmente, no debe haber enlaces S-S intermoleculares presentes.

La Tabla 12 muestra que ni el tipo silvestre ni cualquiera de los mutantes dieron señales fuertes para los enlaces S-S correctos solamente. Se tiene que considerar que la muestra REF-End consiste en una población de especies diferentemente plegadas y covalentemente acumuladas, de tal manera que está presente una mezcla de todas las combinaciones posibles de enlaces de disulfuro y grupos SH libres. Sin embargo, un mutante prometedor debe mostrar cuando menos señales significativas para los puentes S-S correctos, como es el caso para MYC137, así como para los mutantes C28Y+HIS y C28Y – HIS.

En cinco casos, solamente se encontraron enlaces S-S incorrectos, en donde no se obtuvo ninguna señal, o solamente se obtuvo una señal débil, para los enlaces de disulfuro correctos.

Las señales para MYC 123, MYC 138, MYC 139 y MYC 140 fueron extremadamente débiles, y el reanálisis de las muestras no

produjo señales más altas. Aunque se encontraron péptidos específicos de *Mycograb*, los péptidos que contenían cisteína no dieron ninguna señal, o solamente dieron una señal débil. Esto puede deberse a una digestión inefectiva de la porción respectiva de la proteína con tripsina, debido a los sitios de disociación estructuralmente bloqueados. También se observó que los mutantes con mayor longitud del enlazador (5 y 6X en lugar de 3X) fueron más difíciles de digerir, y en consecuencia, no se pudieron detectar señales para los péptidos de elución tardía, o solamente se pudieron detectar difícilmente.

Es interesante que los disulfuros covalentes, con una excepción, solamente se formaron entre dos péptidos T9, que corresponden a los residuos Cys 97.

Los mutantes Myc 118, 119, 130, 133, 137 y los mutantes C28Y+HIS y C28Y – HIS dieron señales más fuertes para los enlaces S-S correctos que el tipo silvestre. Sin embargo, se tiene que considerar que Myc 123 se analizó con un espectrómetro de masas diferente de una sensibilidad más baja, y por consiguiente, no se pueden comparar las intensidades de las señales. Las señales a partir de los péptidos de Myc 123 se pueden comparar con las señales a partir de los mutantes 106 origami, 136, 138, 139 y 140. Para ninguna de estas construcciones se obtuvieron puentes de disulfuro correctos. Solamente se encontraron señales para los disulfuros incorrectos.

Los resultados de Pep Map para Myc 137, Myc C28Y+HIS y

Myc C28Y – HIS, fueron más prometedores, con señales significativas para ambos puentes de disulfuro correctos. Los mutantes Myc 118, Myc 119 y Myc 133 también mostraron cierta cantidad de puente de disulfuro de tipo nativo; sin embargo, la señal para T12-T17 fue débil.

El mutante Myc 130 mostró fuertes señales para el enlace SS T12-T17, pero no se encontró el segundo disulfuro correcto.

Conclusiones

Correlaciones de los resultados analíticos

Las mejores recuperaciones después del repliegue se obtuvieron con MYC 123 (tipo silvestre) y MYC 134, como se determinó mediante el ensayo de titulación con una columna Poros (RPC1).

La solubilización de los cuerpos de inclusión con los agentes caotrópicos fue más rápida que la solubilización con NLS. Los cromatogramas RPC 2 de los cuerpos de inclusión solubilizados con urea ó NLS, fueron comparables. Sin embargo, la SDS-PAGE indicó una potencia de disolución más fuerte del NLS, debido a que se redujo la mancha de agregado, comparándose con los cuerpos de inclusión solubilizados con urea; véase la Figura 14.

El repliegue después de la solubilización con los agentes caotrópicos mediante dilución y el uso de diferentes aditivos, tales como cisteína, L-arginina, NLS al 1 por ciento, y una baja concentración de urea/GuHCl, no mostró un pico monomérico en la RPC 2; véanse las Figuras 12 y 13. La proteína se acumuló

completamente, lo cual fue confirmado mediante SDS-PAGE no reductor, y el cromatograma de RPC 2 mostró un enorme pico 2.

La determinación del peso molecular con la SEC HPLC, NLS al 0.5 por ciento, se correlacionó con una R^2 de 0.77, con el peso molecular teóricamente calculado cuando se excluyó una hilera. La potencia de resolución del SDS-PAGE no fue suficiente para detectar todas las diferentes sutiles en el peso molecular, pero se vio una diferencia del tiempo de migración entre dos mutantes de un peso molecular diferente por 0.6 kDa en la teoría, y 14 kDa medido con la SEC HPLC (MYC 134 y MYC 118, respectivamente).

La cromatografía RPC 2 pudo confirmar una hidrofobicidad reducida de un mutante, en donde 10 aminoácidos hidrofóbicos fueron reemplazados por los más hidrofílicos (MYC 130). El elemento enlazador no tuvo un acceso fácil a los sitios de enlace de la fase estacionaria, y por consiguiente, no tuvo influencia alguna sobre el comportamiento de la retención. También se observó que el análisis Pep Map para las construcciones con una mayor longitud del enlazador, dio señales más débiles para el péptido de interés, comparándose con las construcciones con enlazador más corto. Pareció que el elemento enlazador no fue fácilmente accesible para la enzima de digestión.

Los cromatogramas RPC2 para MYC 137, 138, y 139 mostraron el pico más agudo que se atribuye a un monómero de *Mycograb*, comparándose con los otros mutantes probados, indicando una mayor homogeneidad de la muestra.

El análisis Pep Map mostró que casi no hubo ningún grupo SH libre presente en las muestras REF.End para los mutantes con cuatro cisteínas. Esto indica una formación casi completa de fuentes de disulfuro (los incorrectos y los correctos), así como la formación de agregados covalentes. Para los mutantes con cinco cisteínas, se obtuvieron señales débiles para diferentes grupos SH libres, pero solamente los mutantes Myc 118, Myc 119 y Myc 133 tuvieron un grupo SH libre en T4, la localización de la quinta cisteína que debería permanecer reducida en el monómero "nativo". Ésta es una indicación de que el grupo SH sobre el péptido T4 de preferencia forma enlaces SS, debido a que todos los mutantes con cinco cisteínas dieron señales para los grupos SH libres, pero solamente en tres de ellos se detectó un grupo SH libre en T4.

El peso molecular determinado con SEC HPLC depende mucho de la matriz del regulador en la muestra. Se tuvieron que establecer un par de métodos de SEC HPLC con un regulador de ejecución similar al regulador de la muestra. La dependencia en la matriz de la determinación del peso molecular hace difícil la comparación del peso molecular a través de los pasos del proceso (Tabla 10).

El experimento de UFDF mostró que NLS se retiene hasta algún grado en la solución de muestra, y no se puede remover de una manera eficiente.

Los resultados obtenidos con Pep Map de los mutantes MYC C28Y+HIS, C28Y-HIS y MYC 137, fueron particularmente prometedores. Los resultados indican que se prefiere particularmente

un mutante con una marca HIS y solamente cuatro cisteínas. La marca HIS se requiere para la purificación con IMAC, un paso de purificación de alta eficiencia. Una construcción con solamente cuatro cisteínas tiene más probabilidades de formar disulfuros correctos y menos agregados covalentes.

Efectos de las mutaciones

El efecto más benéfico de las mutaciones se puede atribuir a la remoción de la quinta cisteína. El número de enlaces de disulfuro correctos se incrementó, comparándose con las construcciones con cinco cisteínas. Adicionalmente, se mejoró la solubilidad de los cuerpos de inclusión, comparándose con las construcciones con cinco cisteínas.

El intercambio de la orientación del fragmento de cadena pesada y ligera tuvo un efecto menor sobre el tiempo de retención en la RPC 2, en donde el tiempo de retención disminuyó cuando el elemento VL era C-terminal, comparándose con una orientación N-terminal.

La tendencia de los péptidos a acumularse después de la remoción de NLS se puede incrementar con el número de elementos enlazadores.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido scFv que comprende un dominio V_H y un dominio V_L enlazados por un espaciador de aminoácidos, en donde el dominio V_H comprende la secuencia de la SEQ ID NO:64, y el dominio V_L comprende la secuencia de la SEQ ID NO:66, y en donde el péptido scFv comprende la sustitución o la supresión de un aminoácido en el dominio V_H en la posición correspondiente a C_{28}.

2. Un péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sustitución del aminoácido en el dominio V_H es $C_{28}Y$.

3. Un péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el espaciador de aminoácidos comprende la secuencia $(GGGGS)_n$.

4. Un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende además una marca de purificación, de preferencia una secuencia de seis residuos de histidina en el término C.

5. Un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8, 10, 14, 18 y 22, en donde Xaa denota un residuo de aminoácido diferente de cisteína, y en donde el residuo de metionina N-terminal se puede disociar opcionalmente, de preferencia en donde Xaa denota un residuo de tirosina.

6. Una molécula de ácido nucleico, la cual comprende una

secuencia que codifica un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

7. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, la cual comprende además la secuencia $(taa)_n$, localizada en el extremo 3' de la secuencia que codifica el péptido scFv, en donde **n** es 1 ó 2.

8. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en donde la molécula comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 9, 13, 17 y 21, en donde nnn denota un codón que codifica para un aminoácido diferente de un residuo de cisteína.

9. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la molécula es una molécula de ADN o de ARN.

10. Una composición farmacéutica, la cual comprende un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con un excipiente, diluyente, o vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Una preparación combinada, la cual comprende un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un agente anti-fúngico o un agente contra el cáncer.

12. Una composición que comprende un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un agente anti-fúngico o un agente contra el cáncer.

13. Un método para el tratamiento de un paciente con una

infección fúngica, el cual comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, el cual comprende además el paso de administrar al paciente una cantidad efectiva de un agente anti-fúngico.

15. Un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para utilizarse en el tratamiento de una infección fúngica.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15, o el péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la infección fúngica se debe a un organismo de *Candida, Cryptococcus, Histoplasma, Aspergillus, Torulopsis, Mucormycosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis,* ó *Paracoccidioidomycosis.*

17. La preparación combinada de acuerdo con la reivindicación 11, la composición de acuerdo con la reivindicación 12, el método de acuerdo con la reivindicación 13, 14, ó 16, o el péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16, en donde el agente anti-fúngico es un anti-fúngico de azol, de preferencia seleccionado a partir del grupo que consiste en: itraconazol, voriconazol, isavuconazol, fluconazol, miconazol, quetoconazol, y posaconazol.

18. La preparación combinada de acuerdo con la reivindicación 11, la composición de acuerdo con la reivindicación 12, el método de acuerdo con la reivindicación 13, 14,ó 16, o el

péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 14 ó 16, en donde el agente anti-fúngico se selecciona a partir del grupo que consiste en: un agente anti-fúngico de polieno y un agente anti-fúngico de equinocandina.

19. La preparación combinada, la composición, el método, o el péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el agente anti-fúngico de polieno comprende anfotericina B o un derivado de la misma.

20. Un método para el tratamiento de un paciente con una enfermedad de cáncer, el cual comprende administrar al paciente que lo necesite, una cantidad efectiva de un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20, el cual comprende además el paso de administrar al paciente una cantidad efectiva de cuando menos otro agente contra el cáncer.

22. Un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para utilizarse en el tratamiento de una enfermedad de cáncer.

23. La preparación combinada de acuerdo con la reivindicación 11, la composición de acuerdo con la reivindicación 12, el método de acuerdo con la reivindicación 20 ó 21, o el péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el agente contra el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste en: Doxorrubicina, Daunorrubicina, Epirrubicina, Herceptina, Docetaxel, Cisplatina, Imatinib, Paclitaxel, Docetaxel, Hidroxi-urea, 5-fluoro-

uracilo, Oxaliplatina, Irinotecano, Citarabina, y Raltitrexed.

24. Un método para el tratamiento de un paciente con una condición que involucre niveles elevados de TNFα y/o IL-6, el cual comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

25. Un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para utilizarse en el tratamiento de una condición que involucre niveles elevados de TNFα y/o IL-6.

26. Un método de acuerdo con la reivindicación 24, o un péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la condición que involucra niveles elevados de TNFα y/o IL-6, se selecciona a partir del grupo que consiste en: sepsis, SIRS, y una enfermedad autoinmune.

27. Un método o un péptido scFv de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona a partir del grupo que consiste en: enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, y lupus eritematoso sistémico.

28. Una molécula de vector, la cual comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6a 9.

29. Una célula huésped, la cual comprende una molécula de vector de acuerdo con la reivindicación 28.

30. Un método para producir un péptido scFv de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el cual comprende cultivar

una célula huésped que tenga incorporado en la misma un vector de expresión que contenga, bajo el control de elementos de control de transcripción adecuados, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, bajo condiciones suficientes para la expresión de estos péptidos en la célula huésped, provocando de esta manera la producción del péptido mencionado, y recuperando el péptido producido por esta célula.

RESUMEN

Se da a conocer un péptido scFv, el cual comprende un dominio V_H y un dominio V_L enlazados por un espaciador de aminoácidos. El dominio V_H comprende una secuencia con una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:64. El dominio V_L comprende una secuencia con una identidad de secuencia de cuando menos el 80 por ciento con la secuencia de la SEQ ID NO:66. El péptido scFv también comprende la sustitución o la supresión de un aminoácido en el dominio V_H en la posición correspondiente a C_{28}.

* * * * *

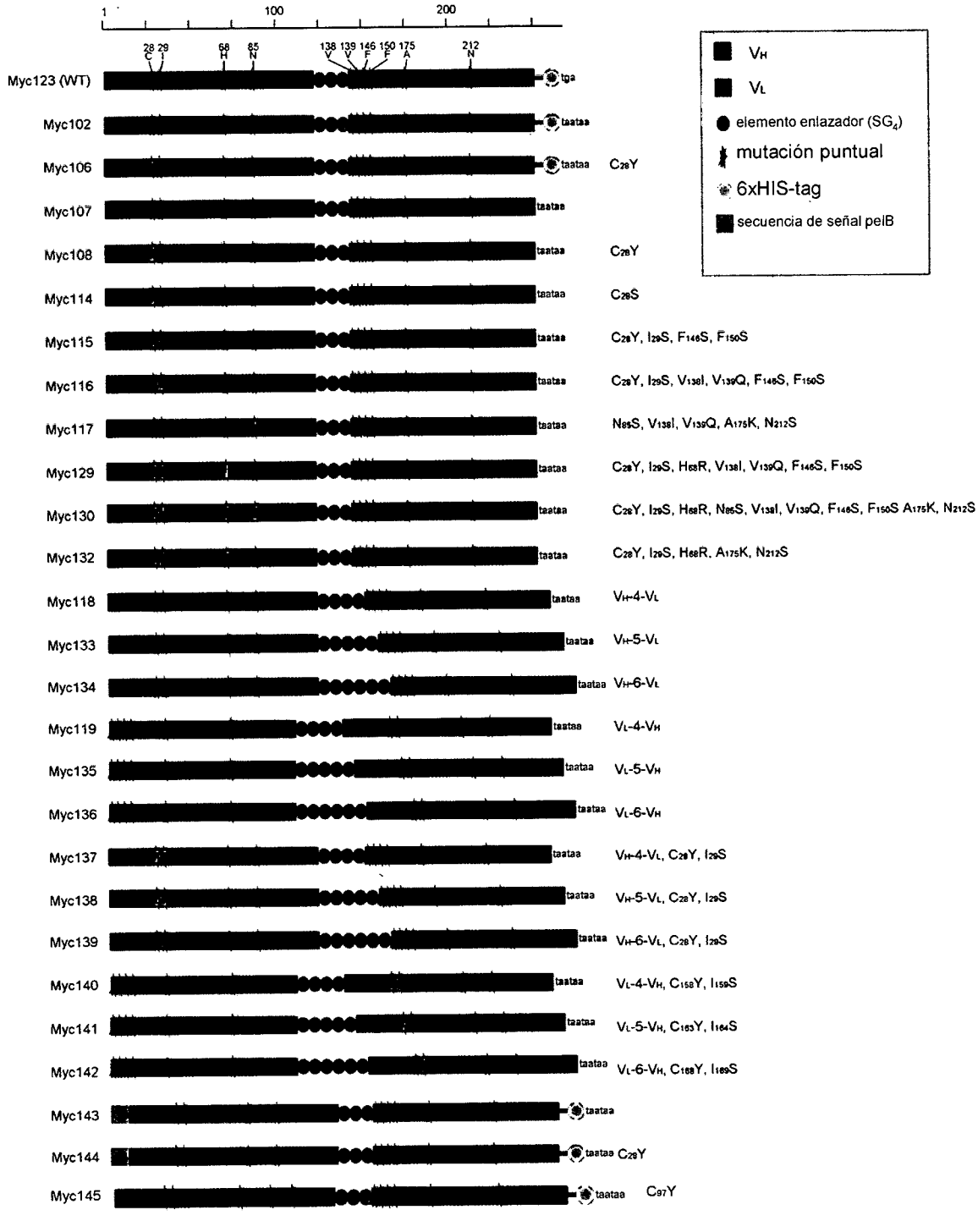

1
100
200
28 29 68 85 138 139 146 150 175 212
C I H N V V F F A N
Myc123 (WT) tga
Myc102 taataa
Myc106 taataa C28Y
Myc107 taataa
Myc108 taataa C28Y
Myc114 taataa C28S
Myc115 taataa C28Y, I29S, F146S, F150S
Myc116 taataa C28Y, I29S, V138I, V139Q, F146S, F150S
Myc117 taataa N85S, V138I, V139Q, A175K, N212S
Myc129 taataa C28Y, I29S, H68R, V138I, V139Q, F146S, F150S
Myc130 taataa C28Y, I29S, H68R, N85S, V138I, V139Q, F146S, F150S A175K, N212S
Myc132 taataa C28Y, I29S, H68R, A175K, N212S
Myc118 taataa VH-4-VL
Myc133 taataa VH-5-VL
Myc134 taataa VH-6-VL
Myc119 taataa VL-4-VH
Myc135 taataa VL-5-VH
Myc136 taataa VL-6-VH
Myc137 taataa VH-4-VL, C28Y, I29S
Myc138 taataa VH-5-VL, C28Y, I29S
Myc139 taataa VH-6-VL, C28Y, I29S
Myc140 taataa VL-4-VH, C158Y, I159S
Myc141 taataa VL-5-VH, C163Y, I164S
Myc142 taataa VL-6-VH, C168Y, I169S
Myc143 taataa
Myc144 taataa C28Y
Myc145 taataa C97Y
VH
VL
elemento enlazador (SG4)
mutación puntual
6xHIS-tag
secuencia de señal pelB

FIG. 1

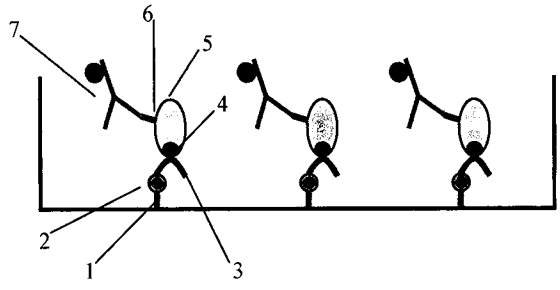

7
6
5
4
2
1
3

FIG. 2

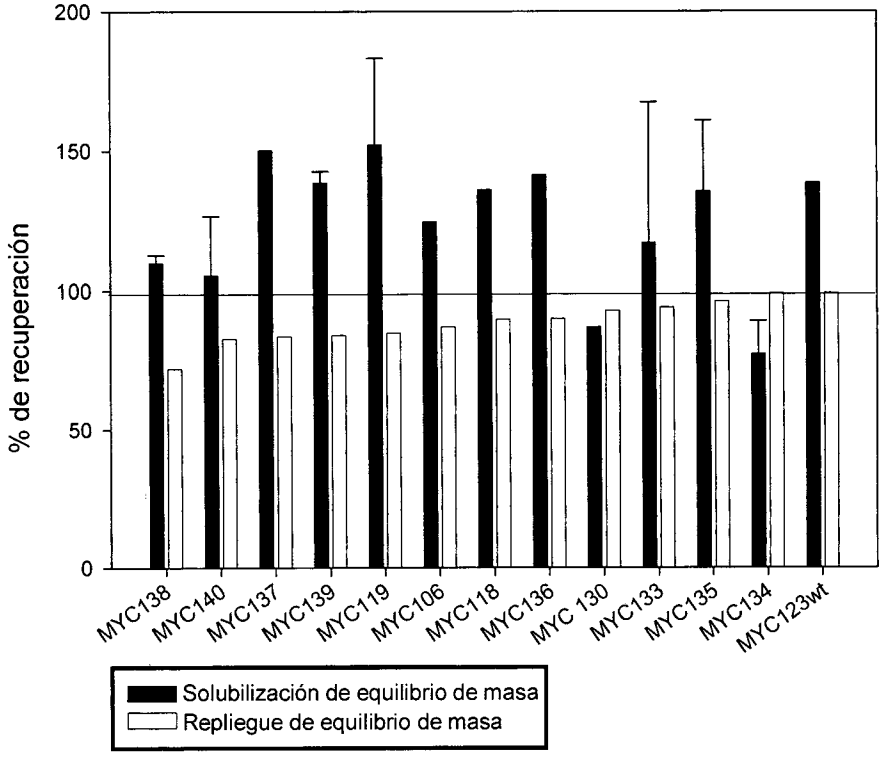

200
150
100
50
0
% de recuperación
MYC138
MYC140
MYC137
MYC139
MYC119
MYC106
MYC118
MYC136
MYC 130
MYC133
MYC135
MYC134
MYC123wt
Solubilización de equilibrio de masa
Repliegue de equilibrio de masa

FIG. 3

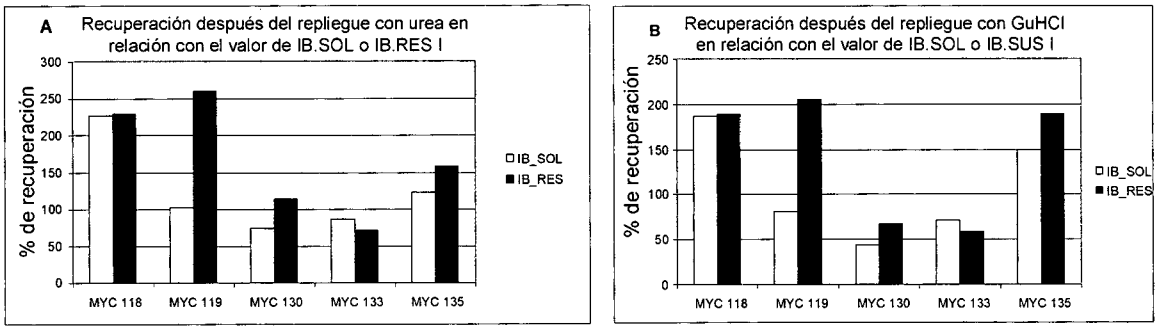

A
Recuperación después del repliegue con urea en relación con el valor de IB.SOL o IB.RES I
% de recuperación
300
250
200
150
100
50
0
MYC 118
MYC 119
MYC 130
MYC 133
MYC 135
IB_SOL
IB_RES
B
Recuperación después del repliegue con GuHCl en relación con el valor de IB.SOL o IB.SUS I
% de recuperación
250
200
150
100
50
0
MYC 118
MYC 119
MYC 130
MYC 133
MYC 135
IB_SOL
IB_RES

FIG. 4

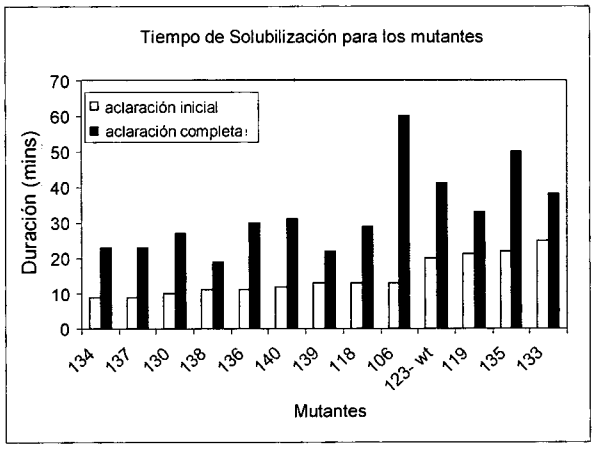

Tiempo de Solubilización para los mutantes
Duración (mins)
70
60
50
40
30
20
10
0
aclaración inicial
aclaración completa
134
137
130
138
136
140
139
118
106
123- wt
119
135
133
Mutantes

FIG. 5

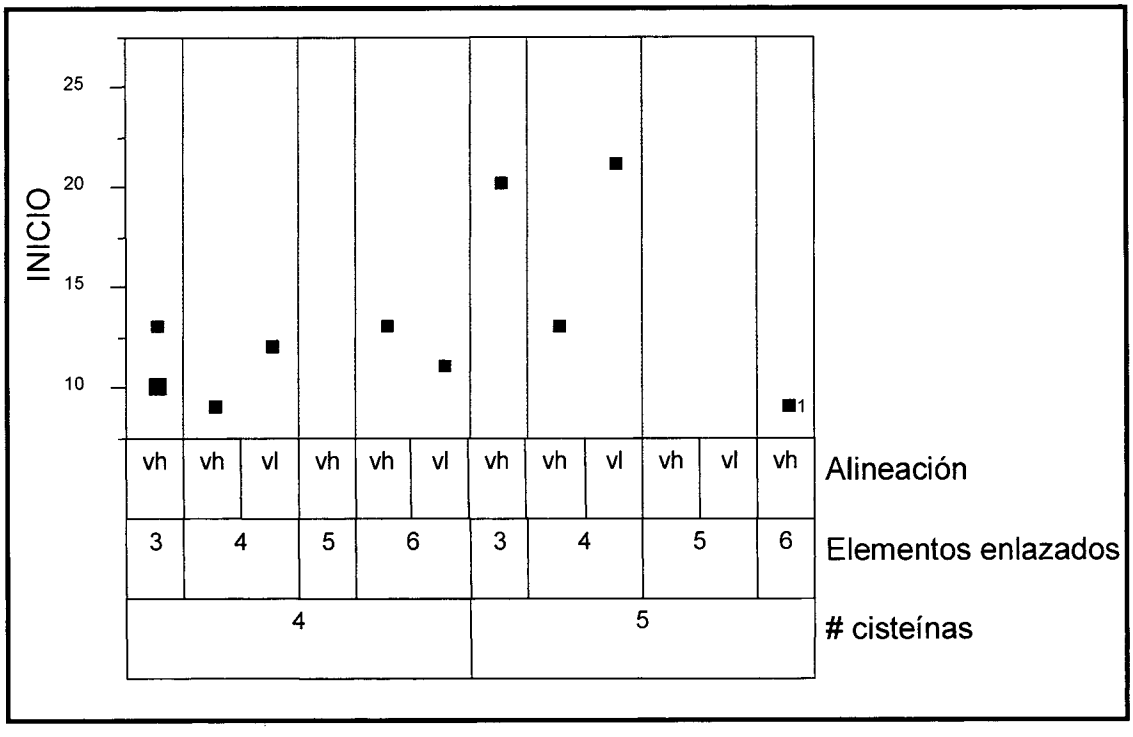

INICIO
25
20
15
10
vh vh vl vh vh vl vh vh vl vh vl vh
Alineación
3 4 5 6 3 4 5 6
Elementos enlazados
4 5
cisteínas

FIG. 6

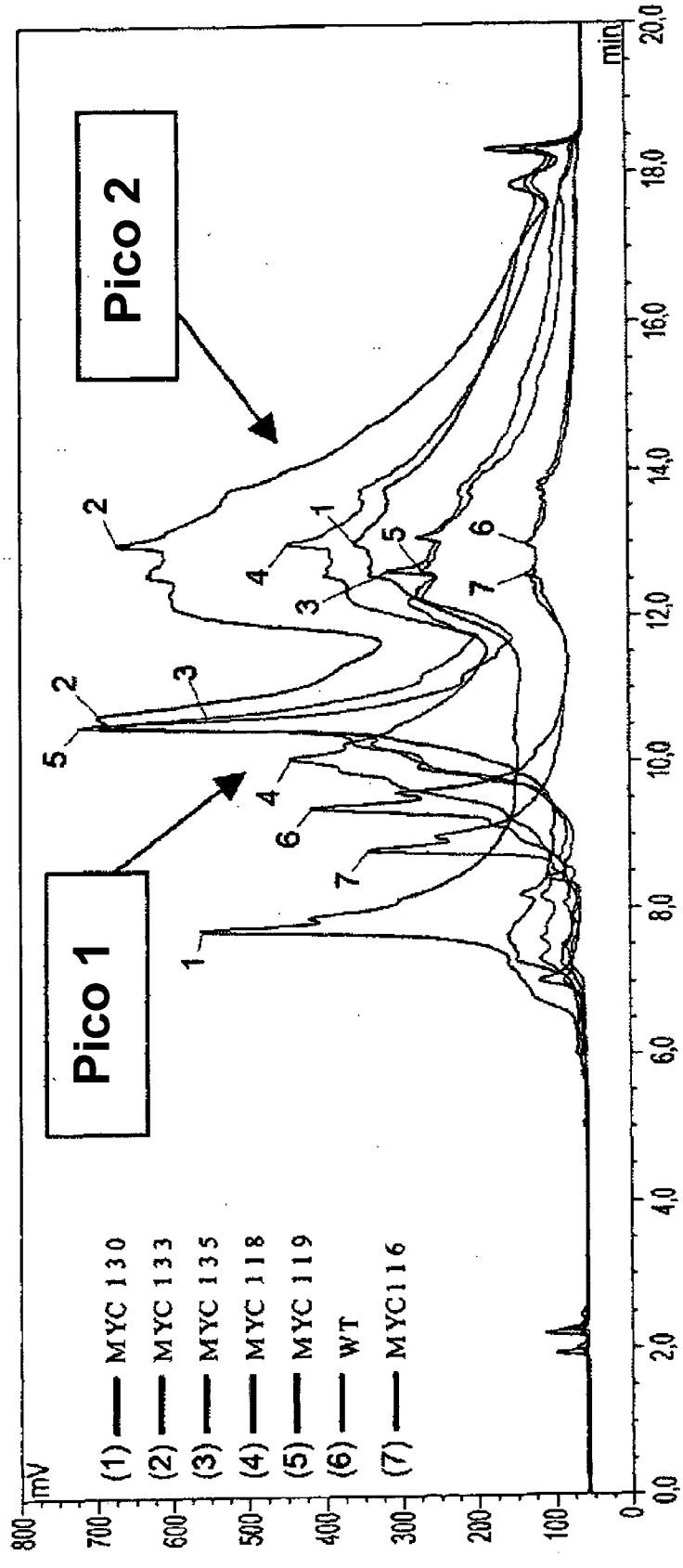

Pico 1
Pico 2
mV
min
(1) MYC 130
(2) MYC 133
(3) MYC 135
(4) MYC 118
(5) MYC 119
(6) WT
(7) MYC116

FIG. 7

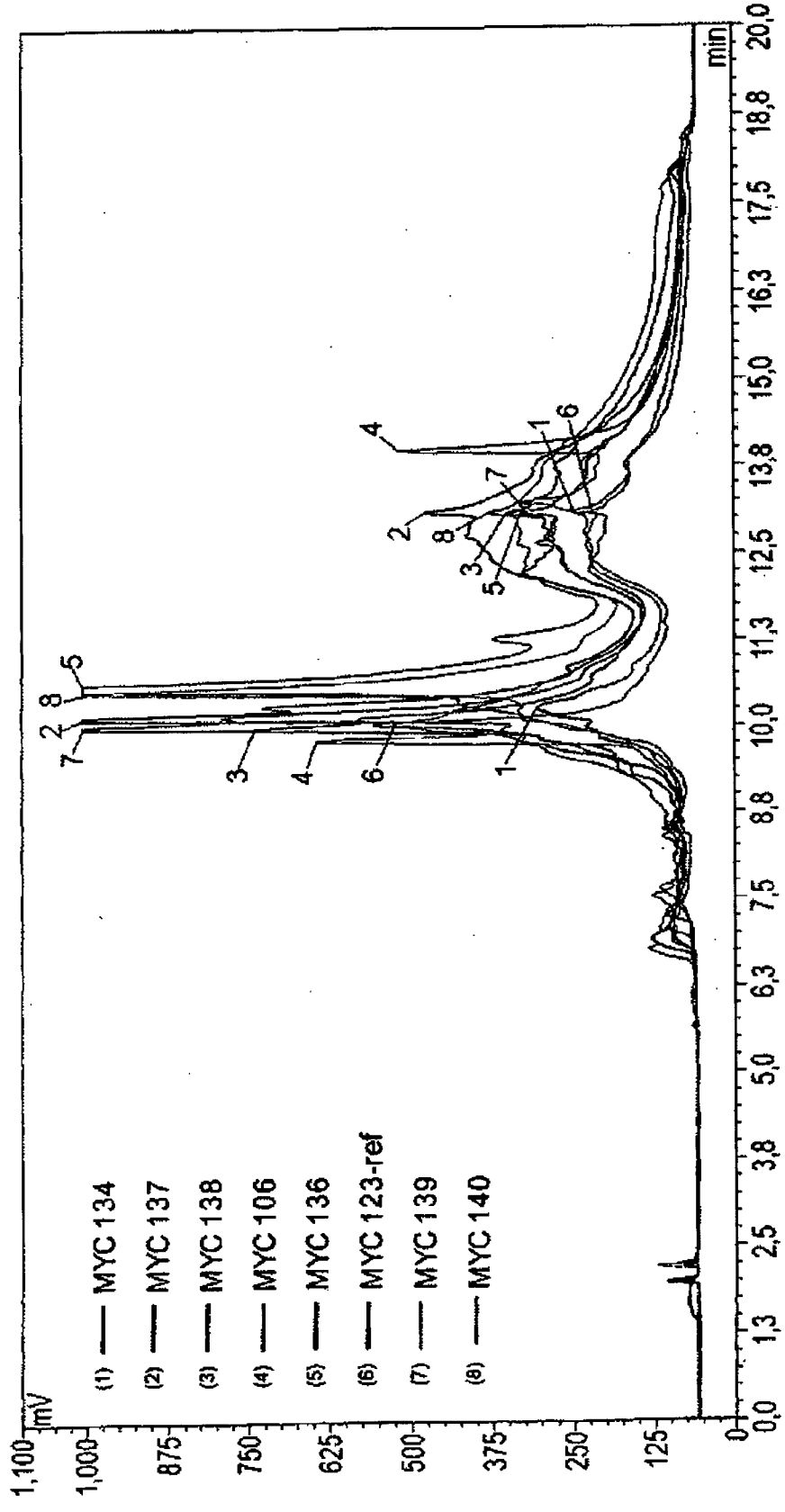

mV
1,100
1,000
875
750
625
500
375
250
125
0
min
0,0
1,3
2,5
3,8
5,0
6,3
7,5
8,8
10,0
11,3
12,5
13,8
15,0
16,3
17,5
18,8
20,0
(1) MYC 134
(2) MYC 137
(3) MYC 138
(4) MYC 106
(5) MYC 136
(6) MYC 123-ref
(7) MYC 139
(8) MYC 140

FIG. 8

Estimaciones a Escala

Factores nominales expandidos a todos los niveles

Factores continuos por promedio, escala por intervalo/2

Término	Estimación a Escala	Error estandar	Proporción t	Sondeos>|t|
Intercepción	10,339265	0,055599	185,96	<,0001*
longitud de enlazador	0,1344474	0,076476	1,76	0,1168
cisteínas	0,0928026	0,052553	1,77	0,1154
configuración[VH]	-0,209796	0,055923	-3,75	0,0056*
configuración[VL]	0,2097961	0,055923	3,75	0,0056*

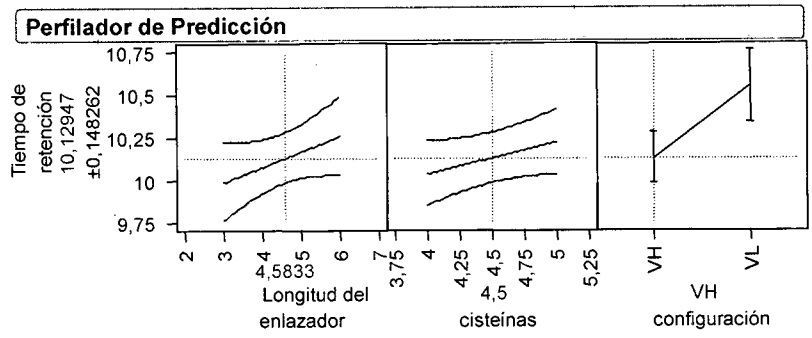


FIG. 9

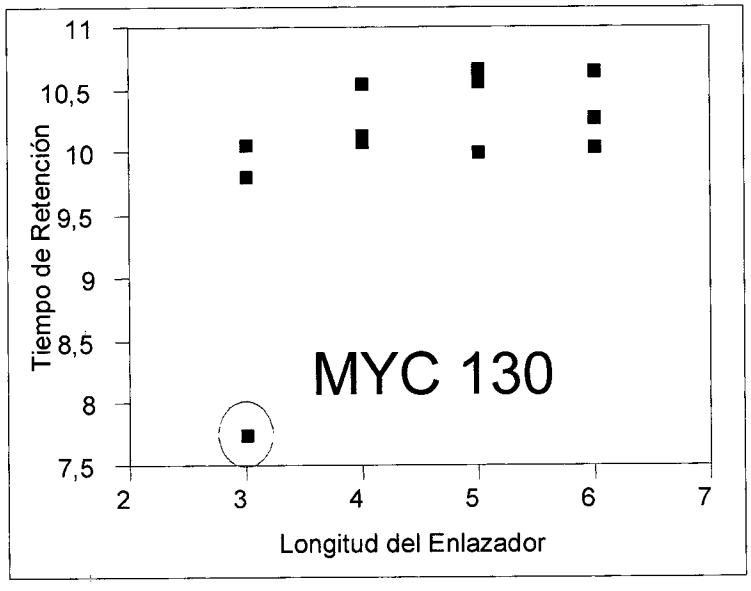
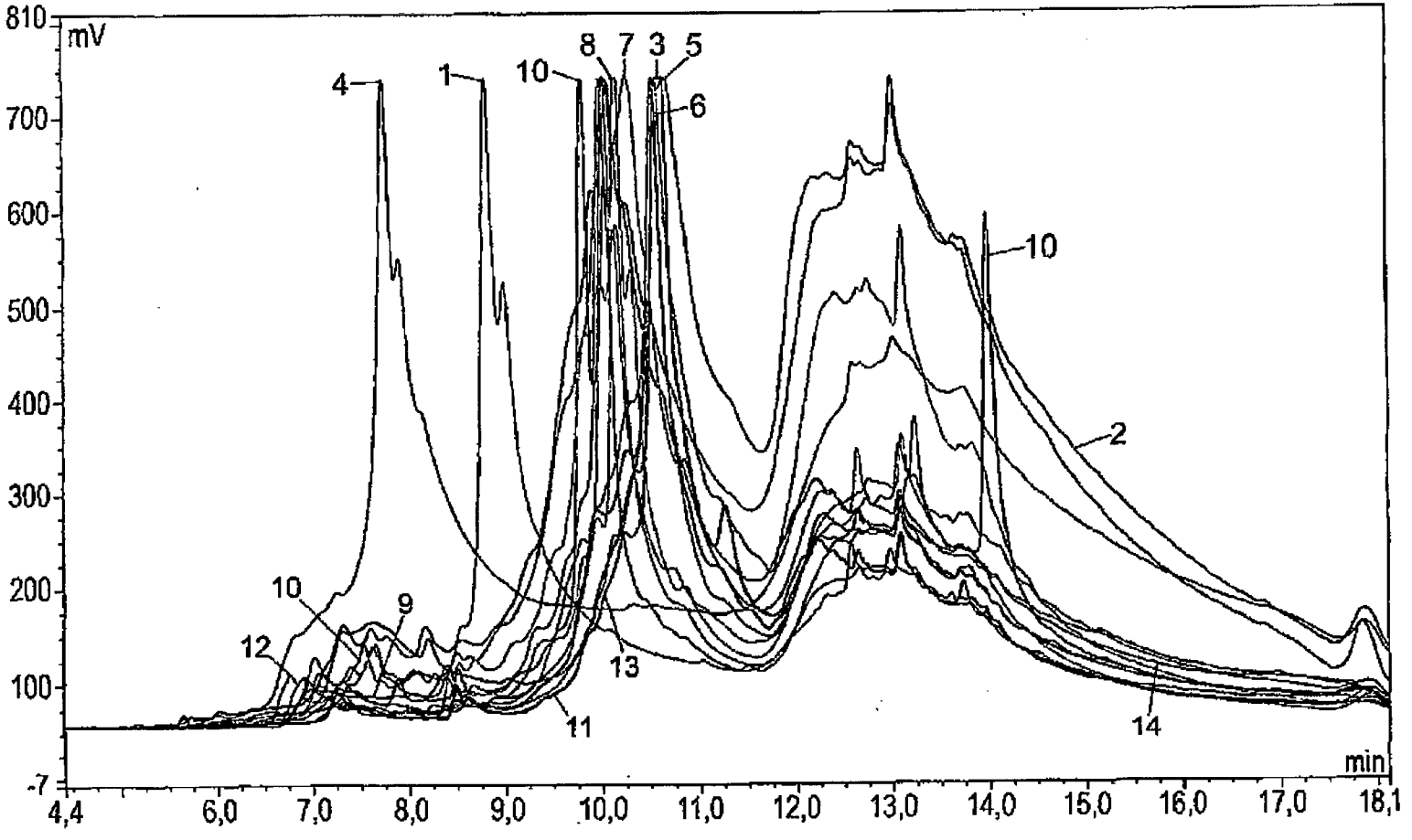


FIG. 10

Fig.11

1. MYC116 de Figura 7 (normalizada)
2. MYC118 de Figura 7 (normalizada)
3. MYC119 de Figura 7 (normalizada)
4. MYC130 de Figura 7 (normalizada)
5. MYC133 de Figura 7 (normalizada)
6. MYC135 de Figura 7 (normalizada)
7. MYC134 de Figura 8 (normalizada)
8. MYC137 de Figura 8 (normalizada)
9. MYC138 de Figura 8 (normalizada)
10. MYC106 de Figura 8 (normalizada)
11. MYC136 de Figura 8 (normalizada)
12. MYC139 de Figura 8 (normalizada)
13. MYC123-ref de Figura 8 (normalizada)
14. MYC140 de Figura 8 (normalizada)



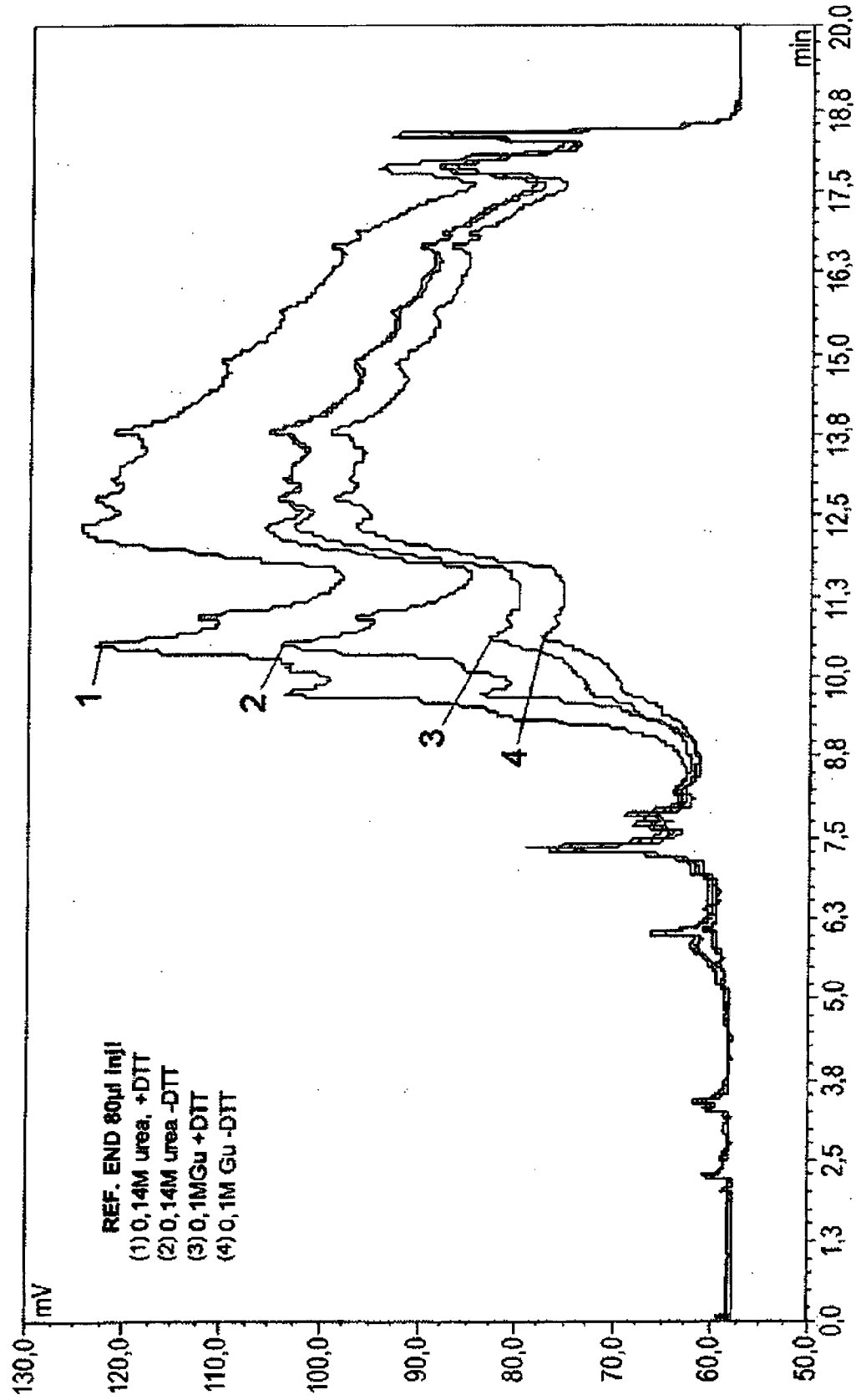

REF. END 80µl Inj!
(1) 0,14M urea, +DTT
(2) 0,14M urea -DTT
(3) 0,1MGu +DTT
(4) 0,1M Gu -DTT
mV
130,0
120,0
110,0
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
0,0
1,3
2,5
3,8
5,0
6,3
7,5
8,8
10,0
11,3
12,5
13,8
15,0
16,3
17,5
18,8
20,0
min
1
2
3
4

FIG. 12

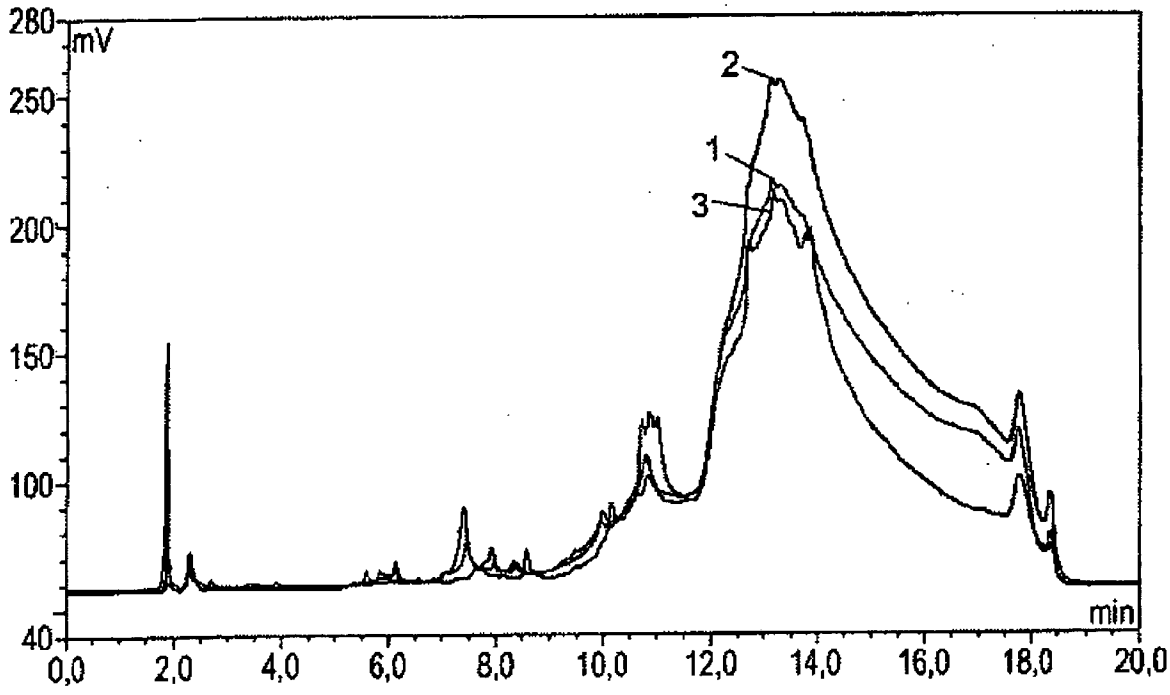
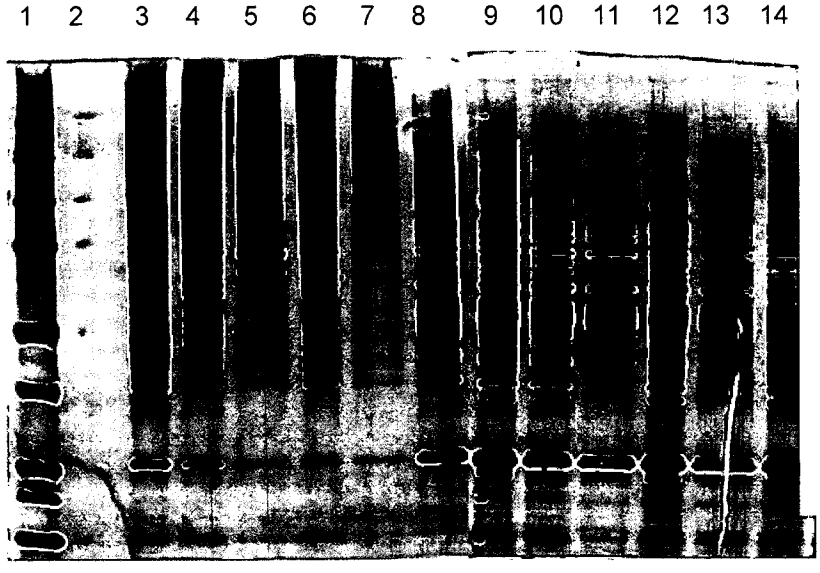


FIG. 13



1: Proteína MWM plus
3: IB_SOL con urea, n-r
4: REF_IM con urea, n-r 1:10
5: REF_IM con urea, n-r 1:50
6:REF_END con urea, n-r 1:10
7: REF_END con urea, n-r 1:50
8: IB_SOL con NLS, n-r
9: IB_SOL con urea, r
10: REF_IM con urea, r 1:10
11: REF_IM con urea, r 1:50
12:REF_END con urea, r 1:10
13: REF_END con urea, r 1:50
14: IB_SOL con NLS, r

FIG. 14

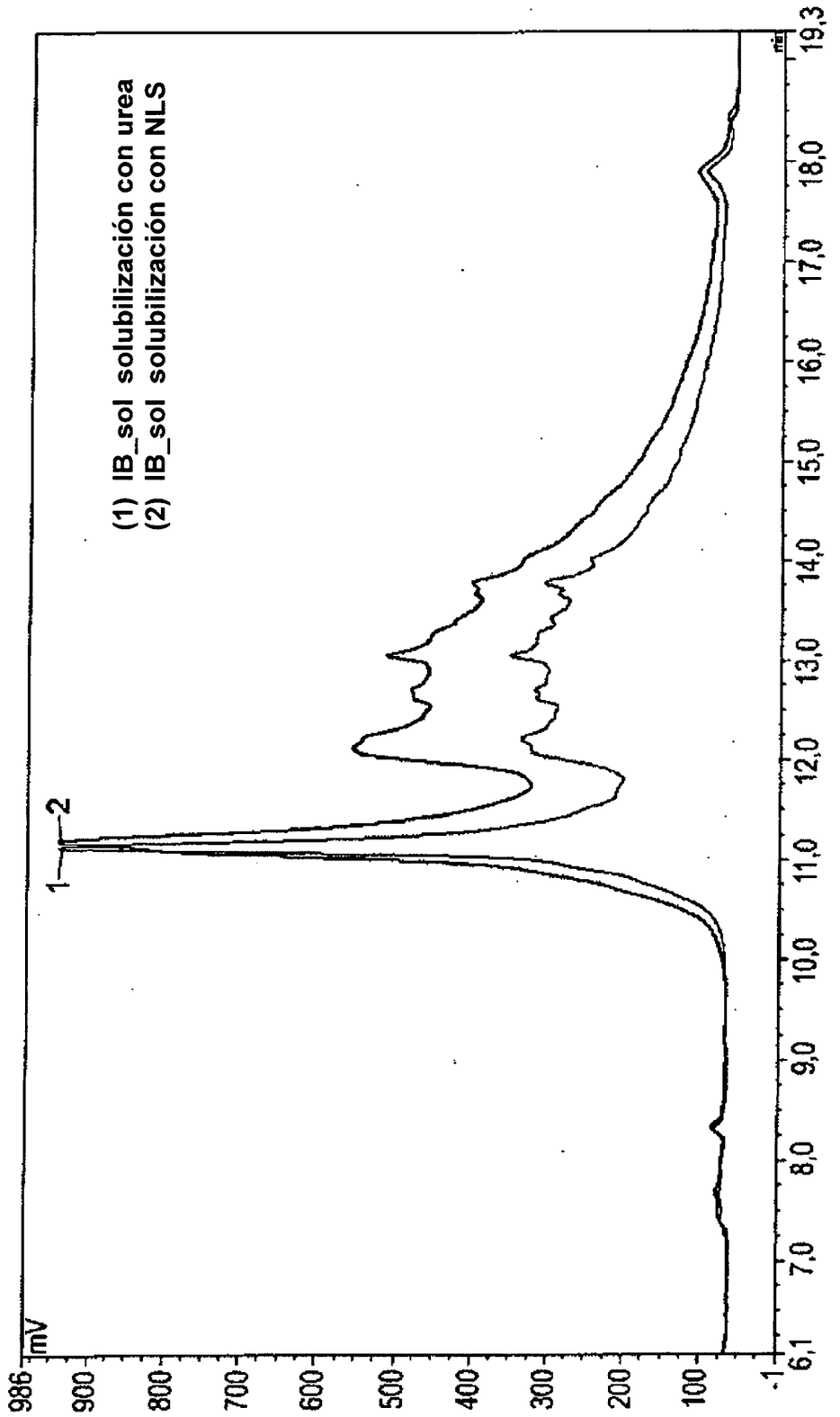
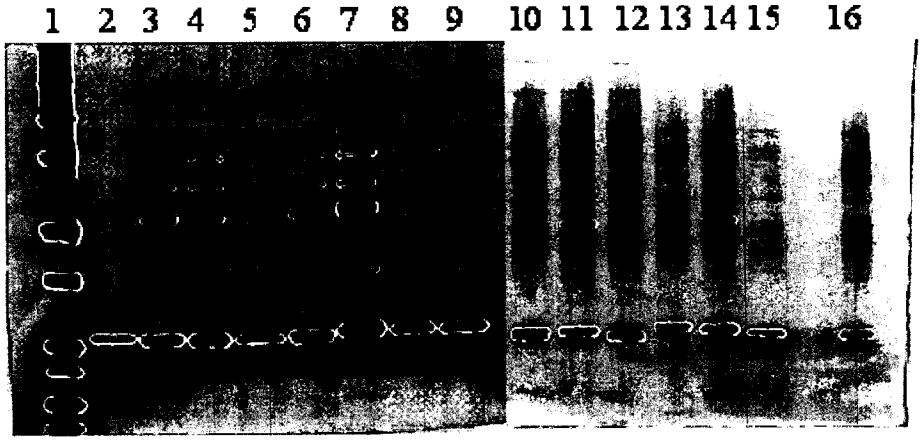
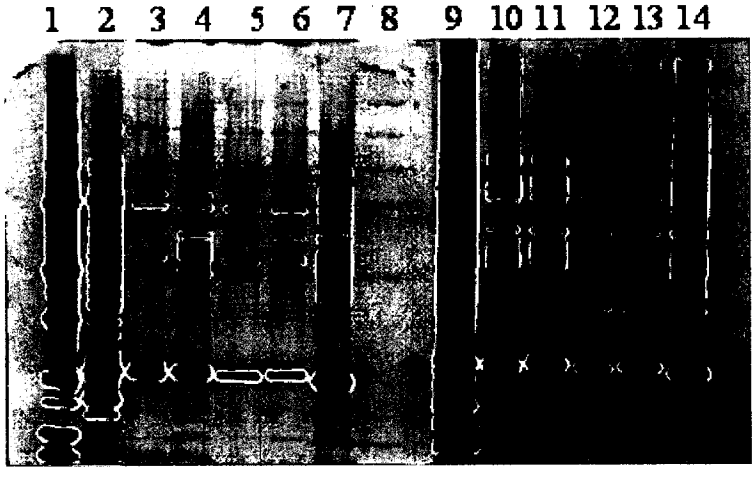

(1) IB_sol solubilización con urea
(2) IB_sol solubilización con NLS
mV
986
900
800
700
600
500
400
300
200
100
-1
6,1
7,0
8,0
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,3
1
2

FIG. 15



1: Proteína plus MWM 2: Referencia Biomeva
3: MYC 118, r 10: MYC 118,n-r
4: MYC 119; r 11: MYC 119 n-r
5: MYC 130; r 12: MYC 133 n-r
6: MYC 133; r 13: MYC 134 n-r
7: MYC 134; r 14: MYC 135 n-r
8: MYC 135; r 15: MYC 137 n-r
9: MYC 137, r 16: MYC 130 n-r

FIG. 16



1: Proteína plus MWM
2: MYC 106, r9: MYC 106,n-r
3: MYC 123; r10: MYC 123n-r
4: MYC 136; r11: MYC 136 n-r
5: MYC 138; r12: MYC 138 n-r
6: MYC 139; r13: MYC 139 n-r
7: MYC 140; r14: MYC 140 n-r

FIG. 17

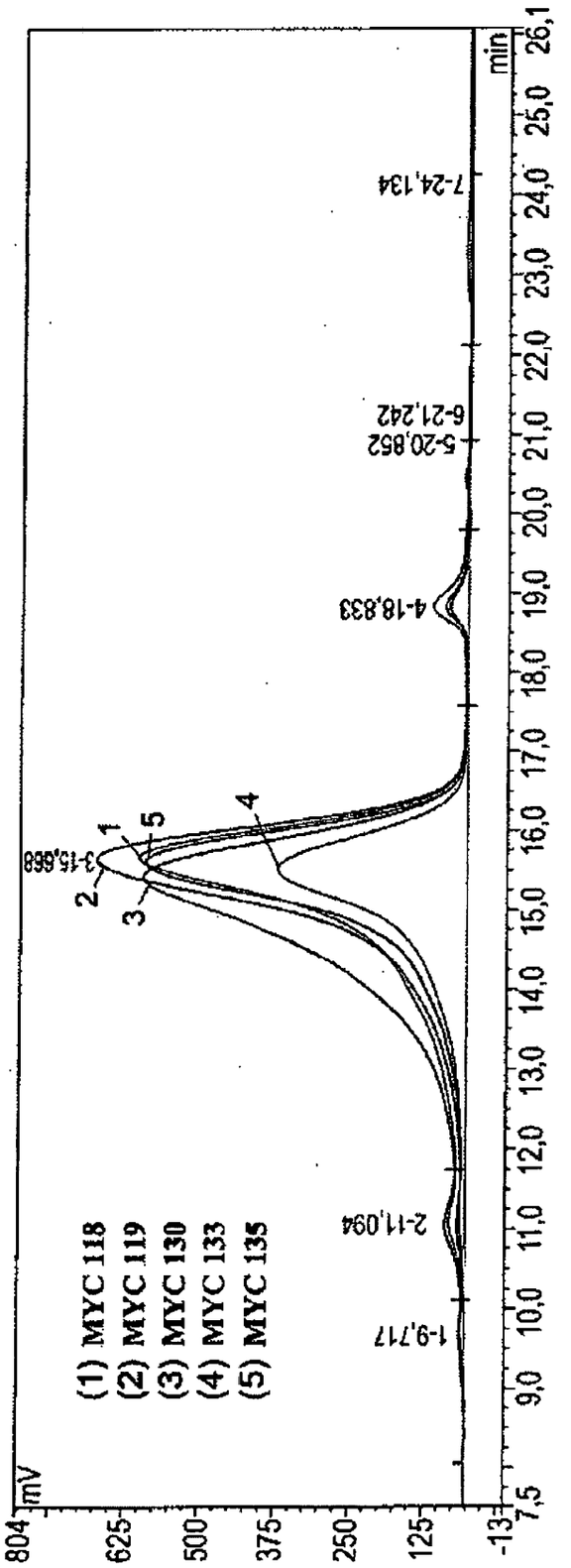

mV
804
625
500
375
250
125
-13
min
7,5
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,1
1-9,717
2-11,094
3-15,668
4-18,833
5-20,852
6-21,242
7-24,134
(1) MYC 118
(2) MYC 119
(3) MYC 130
(4) MYC 133
(5) MYC 135

FIG. 18

266

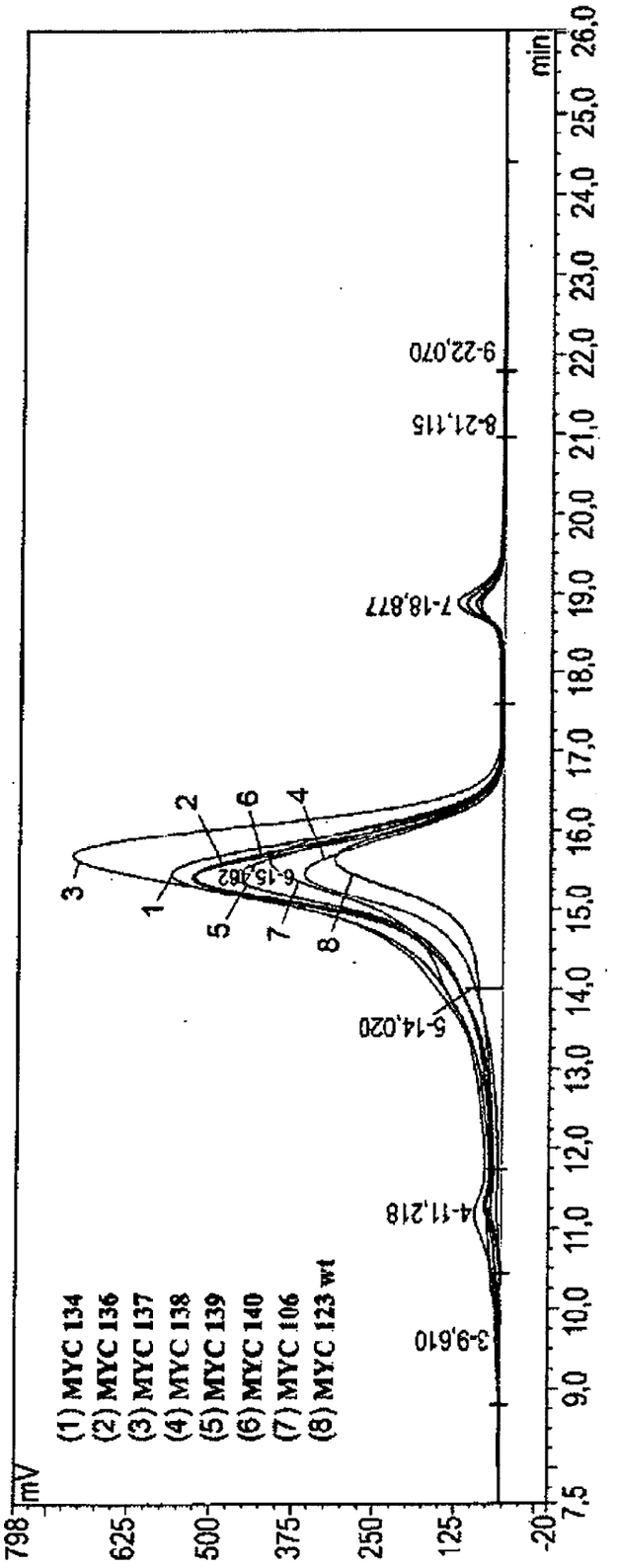

mV
798
625
500
375
250
125
-20
7,5
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,0
min
(1) MYC 134
(2) MYC 136
(3) MYC 137
(4) MYC 138
(5) MYC 139
(6) MYC 140
(7) MYC 106
(8) MYC 123 wt
3-9,610
4-11,218
5-14,020
6-15,382
7-18,877
8-21,115
9-22,070
1
2
3
4
5
6
7
8

FIG. 19

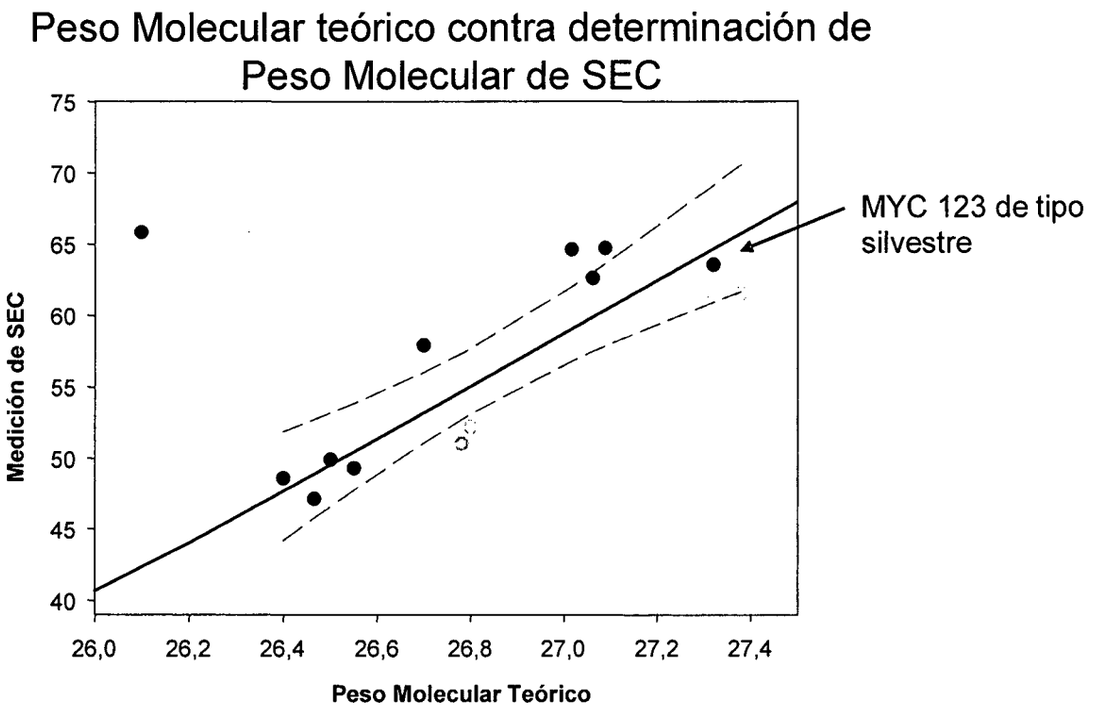
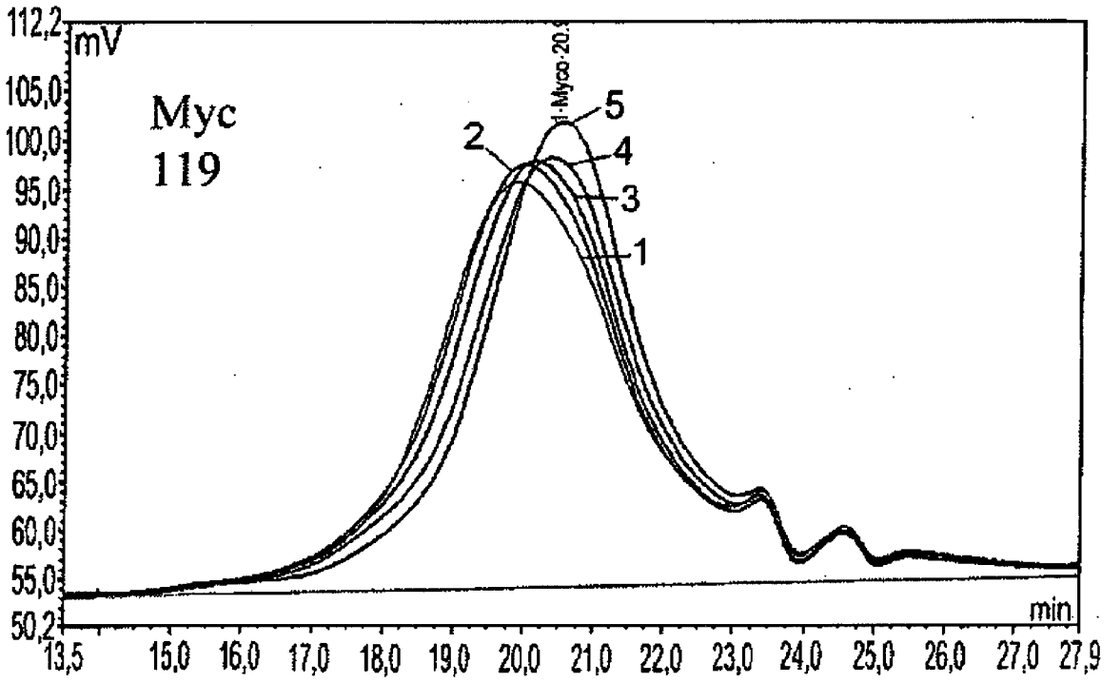

Peso Molecular teórico contra determinación de Peso Molecular de SEC
75
70
65
60
55
50
45
40
Medición de SEC
26,0
26,2
26,4
26,6
26,8
27,0
27,2
27,4
Peso Molecular Teórico
MYC 123 de tipo silvestre

FIG. 20

268


mV
Myc
119
1-Myco-20.
5
4
3
2
1
min
112,2
105,0
100,0
95,0
90,0
85,0
80,0
75,0
70,0
65,0
60,0
55,0
50,2
13,5
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,0
27,0
27,9

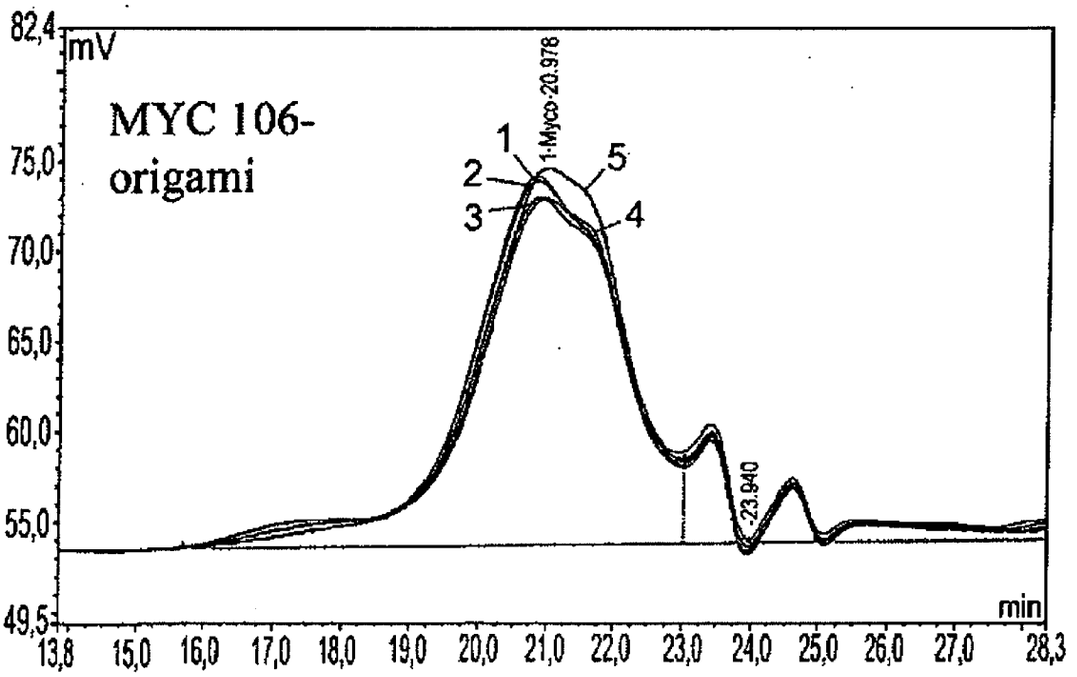
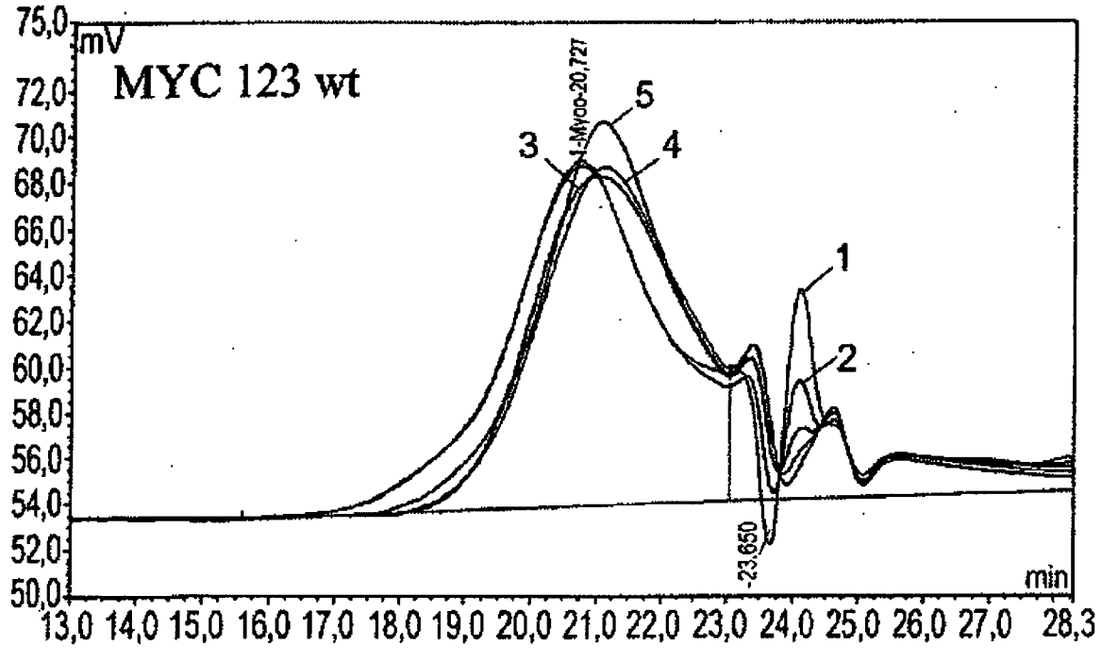

mV
MYC 106-
origami
1-Myco-20.978
1
2
3
5
4
23.940
min
82,4
75,0
70,0
65,0
60,0
55,0
49,5
13,8
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,0
27,0
28,3

FIG. 21

269



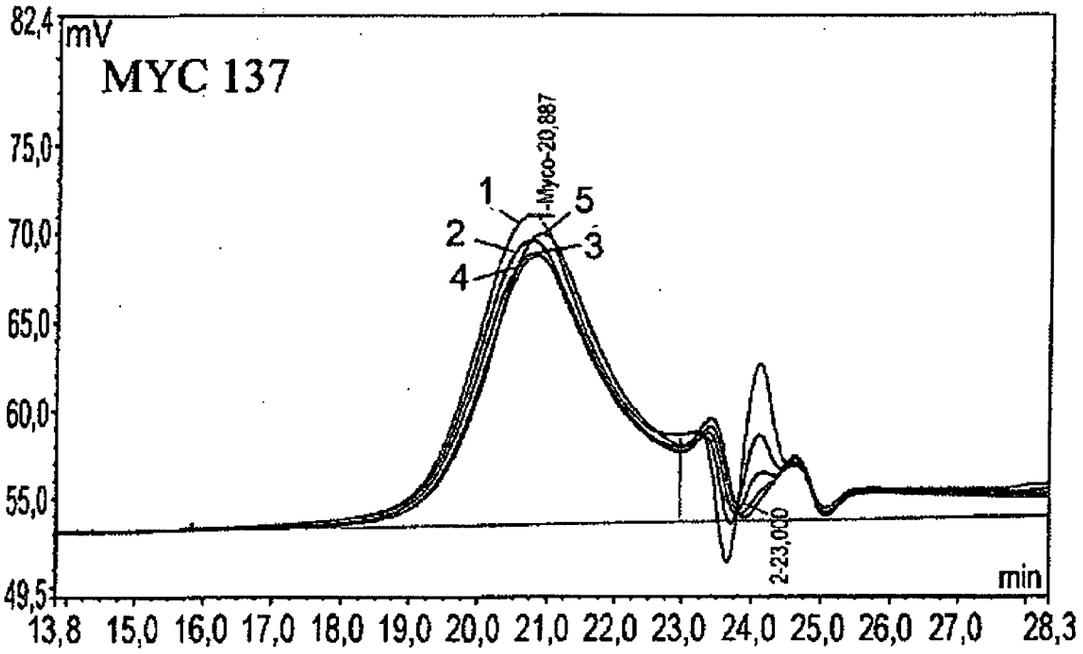


FIG. 21 (cont.)

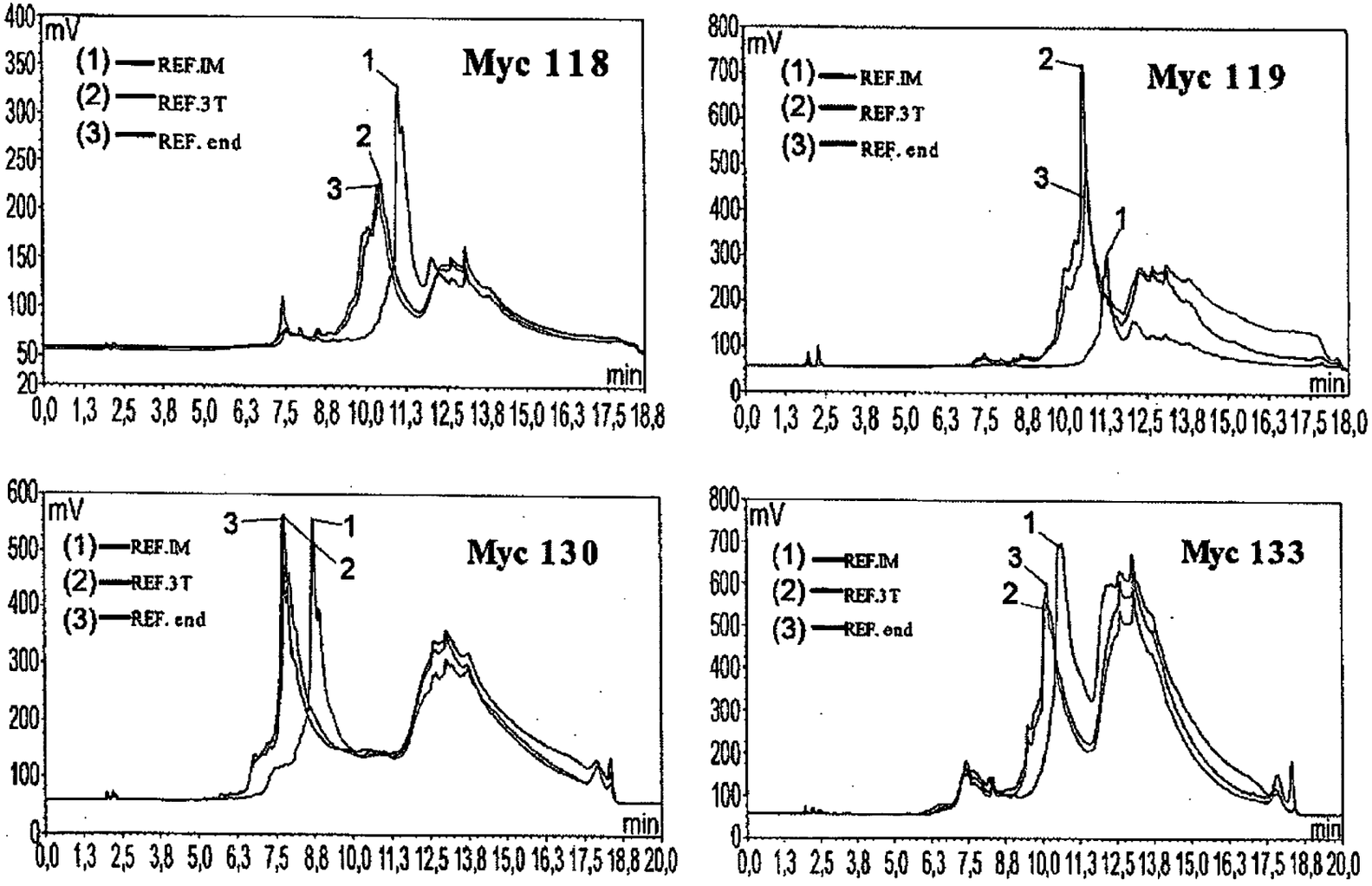

Myc 118
(1) REF.IM
(2) REF.3T
(3) REF. end
mV
min
Myc 119
(1) REF.IM
(2) REF.3T
(3) REF. end
mV
min
Myc 130
(1) REF.IM
(2) REF.3T
(3) REF. end
mV
min
Myc 133
(1) REF.IM
(2) REF.3T
(3) REF. end
mV
min

FIG. 22

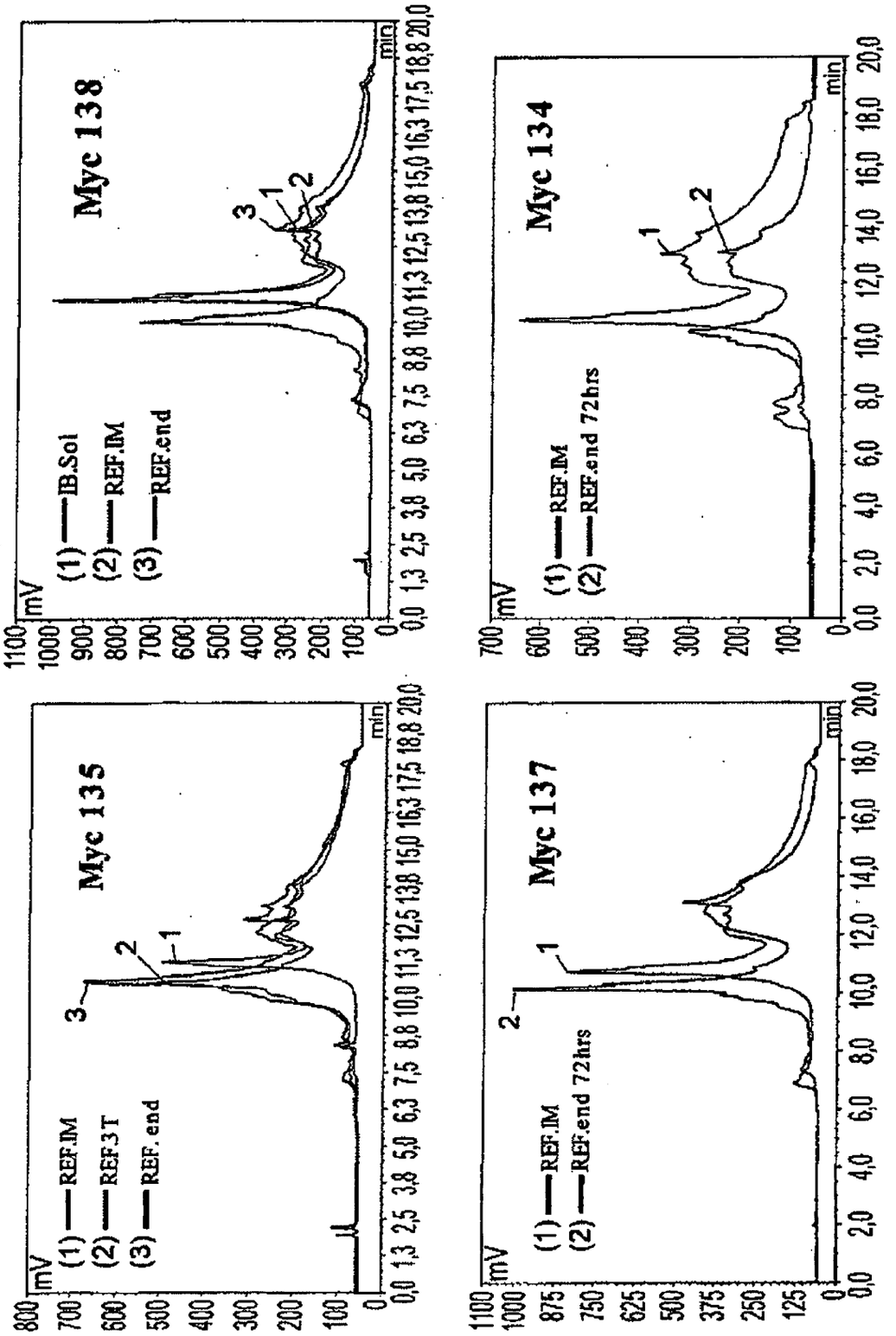


FIG. 22 (cont.)

271

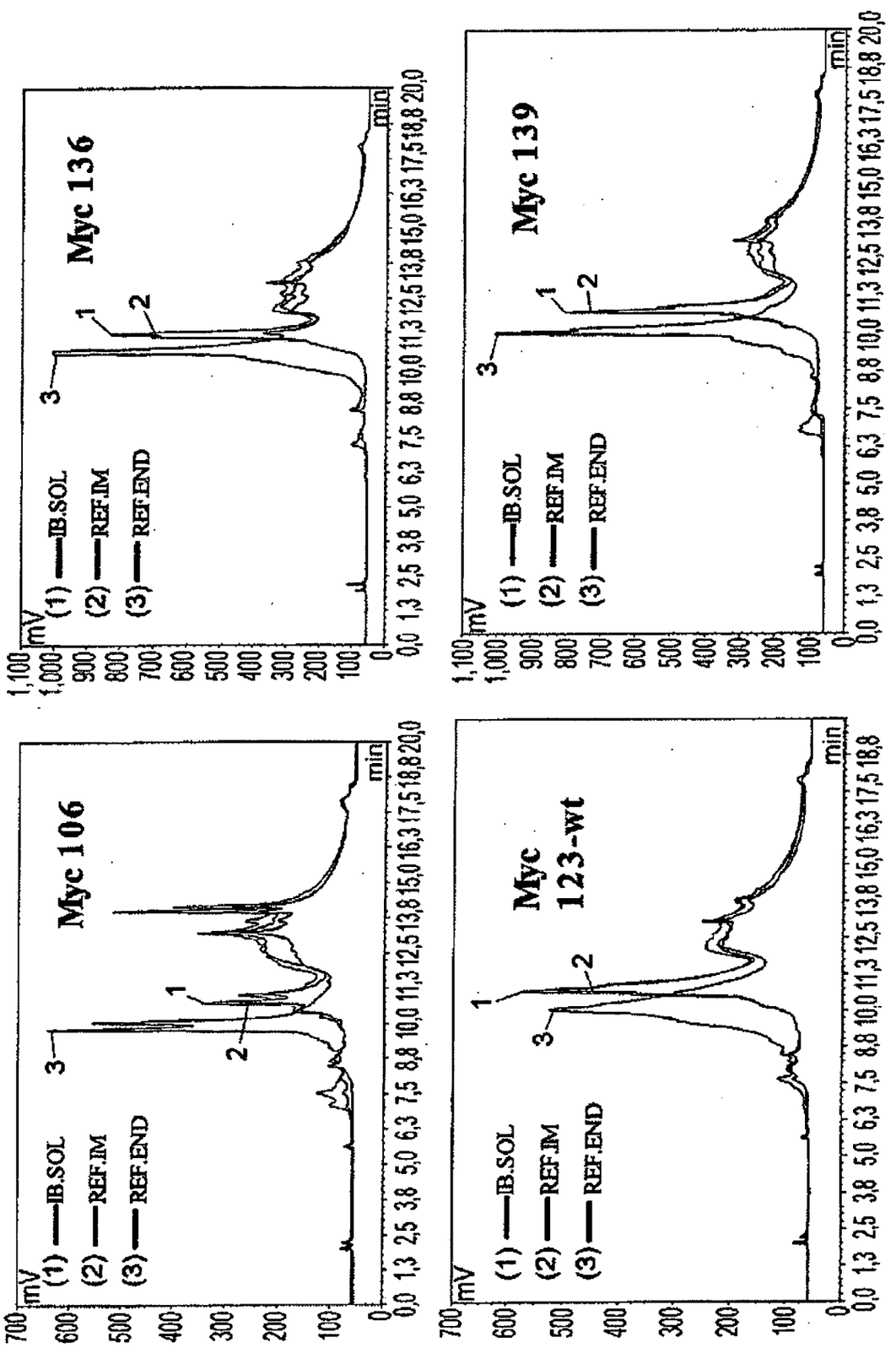

Myc 106
Myc 136
Myc 123-wt
Myc 139
(1) IB.SOL
(2) REF.IM
(3) REF.END
mV
min

FIG. 22 (cont.)

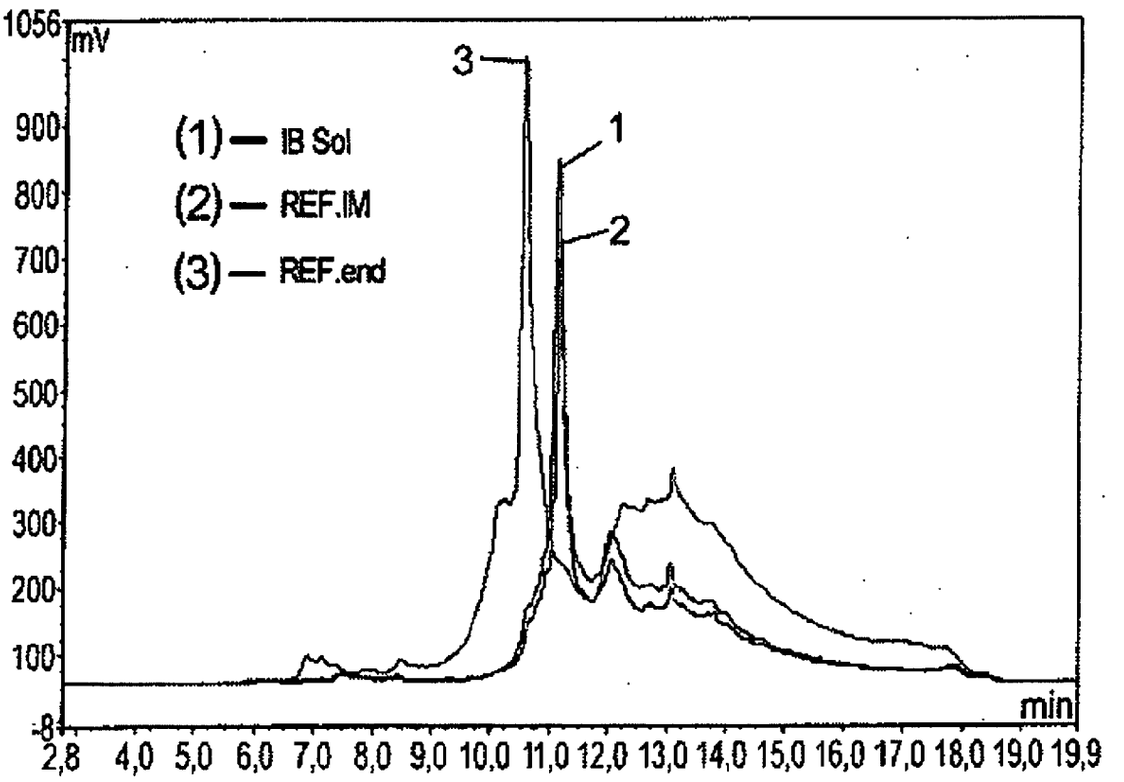

1056
mV
900
800
700
600
500
400
300
200
100
-8
(1) — IB Sol
(2) — REF.IM
(3) — REF.end
3
1
2
min
2,8 4,0 5,0 6,0 7,0 8,0 9,0 10,0 11,0 12,0 13,0 14,0 15,0 16,0 17,0 18,0 19,0 19,9

FIG. 22 (cont.)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> Novedosas Moléculas de Anticuerpos y Ácidos Nucleicos

<130> 50886

<160> 70

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 771

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(771)

<400> 1

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

tga 771

<210> 2

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 2

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



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

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 3

<211> 774

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<400> 3

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

taa taa 774

<210> 4

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 4

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

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

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr

210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His

245 250 255

<210> 5

<211> 756

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(756)

<400> 5

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser

20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144

Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctg gaa taa taa 756
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu
245 250

<210> 6
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construcción Sintética
<400> 6

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

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

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu
245 250

<210> 7
<211> 756
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(756)
<220>
<221> características_varias
<222> (85)..(87)
<223> Un codón que codifica un aminoácido diferente de cisteína

<400> 7
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

```
ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct      96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa     144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg     192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc     240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac     288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
                85                  90                  95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg     336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt     384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc     432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140
```

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctg gaa taa taa 756
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu
245 250

<210> 8

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> características_varias

<222> (29)..(29)

<223> El "Xaa" en la localización 29 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, o Phe.

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 8

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

290

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu
245 250

<210> 9
<211> 774
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<220>

<221> características_varias

<222> (85)..(87)

<223> Un codón que codifica un aminoácido diferente de cisteína

<400> 9

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

292

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

taa taa 774

<210> 10

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> características_varias

<222> (29)..(29)

<223> El "Xaa" en la localización 29 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, o Phe.

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 10

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

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

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 11
<211> 744
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)

<400> 11

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15
ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30
tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

296

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 12

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 12

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

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

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 13
<211> 744
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)
<220>
<221> características_varias
<222> (85)..(87)
<223> Un codón que codifica un aminoácido diferente de cisteína

<400> 13
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15



ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

301

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 14

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> características_varias

<222> (29)..(29)

<223> El "Xaa" en la localización 29 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, o Phe.

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 14

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 15

<211> 744

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<400> 15

atg gcg gaa gtg cag ctg gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 16

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 16

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 17
<211> 744
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(744)
<220>
<221> características_varias

<222> (85)..(87)

<223> Un codón que codifica un aminoácido diferente de cisteína

<400> 17

atg gcg gaa gtg cag ctg gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744

Val Asp Ile Lys Arg Ala

245

<210> 18

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> características_varias

<222> (29)..(29)

<223> El "Xaa" en la localización 29 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, o Phe.

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 18

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

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

<210> 19

<211> 774

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<400> 19

```
atg gcg gaa gtg cag ctg gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg       48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1               5                  10                  15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct       96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
            20                  25                  30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa      144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg      192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
    50                  55                  60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc      240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65                  70                  75                  80
```

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

taa taa 774

<210> 20

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 20

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

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

<210> 21

<211> 774

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<220>

<221> características_varias

<222> (85)..(87)

<223> Un codón que codifica un aminoácido diferente de cisteína

<400> 21

atg gcg gaa gtg cag ctg gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt nnn atc atc tct 96

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser

20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144

Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

taa taa 774

<210> 22

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> características_varias

<222> (29)..(29)

<223> El "Xaa" en la localización 29 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,

o Phe.

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 22

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Xaa Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

320

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 23

<211> 744

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<400> 23

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

321

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc tcc ctg agc gcg agc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 24

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 24

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 25

<211> 744

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<400> 25

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat att cag atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc tcc ctg agc gcg agc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 26

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 26

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 27

<211> 744

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<400> 27

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg agc agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat att cag atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa aaa 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc agc agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 28

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 28

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 29

<211> 759

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(759)

<400> 29

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
130 135 140

gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt 480
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
145 150 155 160

atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg 528
Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
165 170 175

tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct 576
Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
180 185 190

gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc 624
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat 672
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc 720
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
225 230 235 240

ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 759
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250

<210> 30

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 30

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
130 135 140

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
145 150 155 160

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
165 170 175

336

Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
180 185 190

Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250

<210> 31

<211> 762

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(762)

<400> 31

atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc 384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

ggc ggc agc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa 432
Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc 480
Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile
145 150 155 160

atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc 528
Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175

ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac 576
Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr
180 185 190

agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att 624
Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
195 200 205

aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg 672
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220

atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat 720
Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp
225 230 235 240

tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc taa taa 762
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 32

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 32

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile
145 150 155 160

Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175

340

Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr
180 185 190

Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
195 200 205

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220

Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp
225 230 235 240

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 33

<211> 774

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<220>

<221> características_varias

<222> (292)..(294)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 33

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac nnn gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Xaa Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

342

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac cac 768
Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

taa taa 774

<210> 34

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> características_varias

<222> (98)..(98)

<223> El "Xaa" en la localización 98 representa Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, o Phe.

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 34

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Xaa Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
245 250 255

<210> 35

<211> 744

<212> ADN

345

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<400> 35

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cgt gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

```
tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt      384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat att cag atg acc cag agc      432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
    130                 135                 140

ccg agc tcc ctg agc gcg agc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc      480
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145                 150                 155                 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca      528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
                165                 170                 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa      576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
            180                 185                 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc      624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
        195                 200                 205

acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac      672
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
    210                 215                 220
```

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 36
<211> 246
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construcción Sintética
<400> 36

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala
165 170 175
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 37

<211> 744

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<400> 37

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cgt gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg agc agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat att cag atg acc cag agc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140

ccg agc tcc ctg agc gcg agc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc 480
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160

cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa aaa 528
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175

ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa 576
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190

acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc 624
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205

acc ctg acc atc agc agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac 672
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220

Patente

De

Invención

09-119382

Tomo: 3/3

tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa 720

Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240

gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 744

Val Asp Ile Lys Arg Ala

245

<210> 38

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 38

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

1 5 10 15

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser

20 25 30

Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro

50 55 60

Ser Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
130 135 140
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys
145 150 155 160
Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln
180 185 190
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
210 215 220
Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Val Asp Ile Lys Arg Ala
245

<210> 39
<211> 774
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<400> 39

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg 480
Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
145 150 155 160

ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc 528
Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile
165 170 175

agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa 576
Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys
180 185 190

ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt 624
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
195 200 205

ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc 672
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
210 215 220

ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc 720
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser
225 230 235 240

tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg 768
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250 255

taa taa 774

<210> 40

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 40

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
145 150 155 160

Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile
165 170 175

Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys
180 185 190

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
195 200 205

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
210 215 220

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser
225 230 235 240

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250 255

<210> 41

<211> 789

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<400> 41

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tct ggt ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc ccg 480
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc 528
Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg
165 170 175

gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg 576
Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro
180 185 190

ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa acc 624
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr
195 200 205

ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc 672
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
210 215 220

399

ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc 720
Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
225 230 235 240
caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg 768
Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
245 250 255
gac atc aaa cgc gcg taa taa 789
Asp Ile Lys Arg Ala
260

<210> 42
<211> 261
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construcción Sintética
<400> 42
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser
20 25 30
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

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

Asp Ile Lys Arg Ala
260

<210> 43

<211> 777

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<400> 43

atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc tcc ggt ggt 384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct 432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa 480
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
145 150 155 160

ggt tct ggt tgc atc atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag 528
Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln
165 170 175

atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac 576
Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp
180 185 190

agc tat att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc 624
Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
195 200 205

gcc gat aaa agc att aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa 672
Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys
210 215 220

gcg agc gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc 720
Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe
225 230 235 240

ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc 768
Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255

agc taa taa 777
Ser

<210> 44

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 44

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe
225 230 235 240
Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255
Ser

<210> 45
<211> 792
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(792)
<400> 45

atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15
ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30
tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

366

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tct ggt ggt ggc ggc agc ggt ggt 384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gct gaa gtt 432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val
130 135 140

caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg 480
Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
145 150 155 160

cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct tct tac tgg atc 528
Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile
165 170 175

agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa 576
Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys
180 185 190

att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc 624
Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
195 200 205

cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc gct tac ctg caa 672
His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
210 215 220

tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt 720
Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240

ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc 768
Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

ctg gtg acc gtg agc agc taa taa 792
Leu Val Thr Val Ser Ser
260

<210> 46
<211> 262
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Construcción Sintética

<400> 46

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val
130 135 140

Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
145 150 155 160

Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile
165 170 175

Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys
180 185 190

Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
195 200 205
His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
210 215 220
Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240
Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Leu Val Thr Val Ser Ser
260

<210> 47
<211> 759
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(759)

<400> 47
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

370

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
130 135 140

gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt 480
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
145 150 155 160

atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg 528
Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
165 170 175

tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct 576
Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
180 185 190

gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc 624
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat 672
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc 720
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
225 230 235 240

ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg taa taa 759
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250

<210> 48

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 48

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
130 135 140

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
145 150 155 160

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
180 185 190
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
225 230 235 240
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250

<210> 49
<211> 774
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<400> 49
atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg 480
Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
145 150 155 160

ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc 528
Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile
165 170 175

agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa 576
Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys
180 185 190

ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt 624
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
195 200 205

ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc 672
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
210 215 220

ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc 720
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser
225 230 235 240

tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg 768
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250 255

taa taa 774

<210> 50

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 50

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
145 150 155 160

Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile
165 170 175

Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys
180 185 190

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg
195 200 205

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
210 215 220

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser
225 230 235 240

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
245 250 255

<210> 51

<211> 789

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<400> 51

atg gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct 96
Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa 144
Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg 192
Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc 240
Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac 288
Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg 336
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt ggt ggc ggc agc ggt 384
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

ggt ggc gga tct ggt ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt 432
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

329

ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt gtg atg acc cag agc ccg 480
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160

agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc 528
Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg
165 170 175

gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg 576
Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro
180 185 190

ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct gca agc acc ctg caa acc 624
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr
195 200 205

ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc 672
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
210 215 220

ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc 720
Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
225 230 235 240

caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg 768
Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
245 250 255

gac atc aaa cgc gcg taa taa 789
Asp Ile Lys Arg Ala
260

<210> 52

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 52

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

Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
145 150 155 160
Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg
165 170 175
Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro
180 185 190
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr
195 200 205
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
210 215 220
Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
225 230 235 240
Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
245 250 255
Asp Ile Lys Arg Ala
260

<210> 53
<211> 762
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(762)

<400> 53

atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc 384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

ggc ggc agc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa 432
Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc 480
Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser
145 150 155 160

atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc 528
Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175

ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac 576
Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr
180 185 190

agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att 624
Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
195 200 205

aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg 672
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220

atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat 720
Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp
225 230 235 240

tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc taa taa 762
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 54

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 54

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser
145 150 155 160
Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly
165 170 175
Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr
180 185 190
Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile
195 200 205
Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
210 215 220
Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp
225 230 235 240
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 55
<211> 777
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido scFv
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(777)

<400> 55

atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc tcc ggt ggt 384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct 432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa 480
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
145 150 155 160

ggt tct ggt tat agc atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag 528
Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln
165 170 175

atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac 576
Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp
180 185 190

agc tat att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc 624
Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
195 200 205

gcc gat aaa agc att aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa 672
Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys
210 215 220

gcg agc gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc 720
Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe
225 230 235 240

ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc 768
Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255

agc taa taa 777

Ser

<210> 56

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 56

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

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys
145 150 155 160
Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln
165 170 175
Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp
180 185 190
Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser
195 200 205
Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys
210 215 220
Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe
225 230 235 240
Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255
Ser

<210> 57

<211> 792

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(792)

<400> 57

atg gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt 48
Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val
1 5 10 15

ggt gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc 96
Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg
20 25 30

tat ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

ggt agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln
65 70 75 80

ccg gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ctg acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg agc ggt 336
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc gga tct ggt ggt ggc ggc agc ggt ggt 384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

ggc gga tcc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gct gaa gtt 432
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val
130 135 140

caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg 480
Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
145 150 155 160

cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tat agc atc tct tct tac tgg atc 528
Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Tyr Trp Ile
165 170 175

agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa 576
Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys
180 185 190

att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc 624
Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
195 200 205

cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc gct tac ctg caa 672
His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
210 215 220

tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt 720
Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240

342

ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc 768

Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

245 250 255

ctg gtg acc gtg agc agc taa taa 792

Leu Val Thr Val Ser Ser

260

<210> 58

<211> 262

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 58

Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val

1 5 10 15

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro

85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ser Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val
130 135 140
Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu
145 150 155 160
Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Tyr Trp Ile
165 170 175
Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys
180 185 190
Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly
195 200 205
His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
210 215 220
Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
225 230 235 240
Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255
Leu Val Thr Val Ser Ser
260

<210> 59

<211> 837

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(837)

<400> 59

atg aaa tac ctg ctg ccg acc gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct 48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

gcc cag ccg gcg atg gcc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct 96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
20 25 30

gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct 144
Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
35 40 45

ggt tgc atc atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg 192
Gly Cys Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro
50 55 60

ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat 240
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr
65 70 75 80

att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat 288
Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp
85 90 95

345

aaa agc att aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc 336
Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser
100 105 110

gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat 384
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp
115 120 125

agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt 432
Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt 480
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
145 150 155 160

gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt 528
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
165 170 175

atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg 576
Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
180 185 190

tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct 624
Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
195 200 205

gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc 672
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220

346

agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat 720
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225 230 235 240

ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc 768
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
245 250 255

ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac 816
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
260 265 270

cac cac cac cac cac taa taa 837
His His His His His
275

<210> 60

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 60

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
20 25 30

Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
35 40 45

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

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
260 265 270

His His His His His
275

<210> 61

<211> 837

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(837)

<400> 61

atg aaa tac ctg ctg ccg acc gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct 48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

gcc cag ccg gcg atg gcc gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct 96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
20 25 30

gaa gtt aaa aaa ccg ggt gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct 144
Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
35 40 45

ggt tat atc atc tct tct tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg 192
Gly Tyr Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro
50 55 60

ggc aag ggc ctg gaa tgg atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat 240
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr
65 70 75 80

att aac tac agc ccg agc ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat 288
Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp
85 90 95

aaa agc att aac acc gct tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc 336
Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser
100 105 110

gac acc gcg atg tac tac tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat 384
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp
115 120 125

agc ttc gat tac tgg ggt cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc ggt 432
Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140

ggt ggc ggc agc ggt ggt ggc ggc agc ggc ggc ggc ggc agc gat gtt 480
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
145 150 155 160

gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt gac cgt 528
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
165 170 175

400

atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat ctg gcg 576
Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
180 185 190

tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc tat gct 624
Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
195 200 205

gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt agc ggc 672
Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220

agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg gag gat 720
Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225 230 235 240

ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg acc ttc 768
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
245 250 255

ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg gcc gca ctc gag cac 816
Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
260 265 270

cac cac cac cac cac taa taa 837
His His His His His
275

<210> 62

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 62

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala
20 25 30

Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro
50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr
65 70 75 80

Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp
85 90 95

Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser
100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp
115 120 125

Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
145 150 155 160

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg
165 170 175

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala
180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
195 200 205

Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210 215 220

Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
225 230 235 240

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
260 265 270

His His His His His
275

<210> 63

<211> 363

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 63

gct gaa gtt caa ctt gtt gaa tct ggt gct gaa gtt aaa aaa ccg ggt 48
Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

gaa tct ctg cgt atc tct tgc aaa ggt tct ggt tgc atc atc tct tct 96
Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser
20 25 30

tac tgg atc agc tgg gtt cgt cag atg ccg ggc aag ggc ctg gaa tgg 144
Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

atg ggt aaa att gat ccg ggc gac agc tat att aac tac agc ccg agc 192
Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

ttt cag ggc cat gtt acc atc agc gcc gat aaa agc att aac acc gct 240
Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala
65 70 75 80

tac ctg caa tgg aac agc ctg aaa gcg agc gac acc gcg atg tac tac 288
Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95

tgt gcc cgt ggc ggt cgt gac ttc ggt gat agc ttc gat tac tgg ggt 336
Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc agc 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 64

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

Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile Ser Ser
20 25 30

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

Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala
65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65

<211> 327

105

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del Péptido scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 65

```
gat gtt gtg atg acc cag agc ccg agc ttc ctg agc gcg ttc gtt ggt       48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly
1               5                   10                  15

gac cgt atc acc att acc tgc cgc gcc agc agc ggc atc agc cgc tat       96
Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

ctg gcg tgg tat cag caa gca ccg ggt aaa gca ccg aaa ctg ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gct gca agc acc ctg caa acc ggc gtt ccg agc cgt ttt agc ggt      192
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc ggc agc ggc acc gag ttc acc ctg acc atc aac agc ctg caa ccg      240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
```

106

gag gat ttt gcc acc tat tac tgc caa cac ctg aat agc tat ccg ctg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

acc ttc ggt ggc ggc acc aaa gtg gac atc aaa cgc gcg 327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 66

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 66

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

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala

100 105

<210> 67

<211> 66

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de señal pelB

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(66)

<400> 67

atg aaa tac ctg ctg ccg acc gct gct gct ggt ctg ctg ctc ctc gct 48

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

gcc cag ccg gcg atg gcc 66

Ala Gln Pro Ala Met Ala

20

<210> 68

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 68

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala
20

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

<213> *Candida albicans*

<400> 69

Asn Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys
1 5 10

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido mezclado

<400> 70

Ser Phe Lys Trp Gly Val Thr Thr Ser Leu Ser Tyr Phe Pro Lys
1 5 10 15

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ EP 18 December 2008

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND

Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

Applicant's or agent's file reference: G03578

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority date *(day/month/year)*
PCT/EP2008/055006	24 April 2008 (24.04.08)	27 April 2007 (27.04.07)

Title of invention: Mutant Mycograb

Box No. II APPLICANT(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

Novartis AG
Lichtstrasse 35
CH-4056 Basel
Switzerland

Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:
Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
CH	CH

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

Burnie, James
1 Gresytoke Drive
Alderley Edge
Cheshire SK9 7PY
United Kingdom

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
GB	GB

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

Wechner, Philipp
Hussistrasse 27c
A-6130 Schwaz
Austria

State *(that is, country)* of nationality:	State *(that is, country)* of residence:
AT	AT

☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet.

International application No.
PCT/EP2008/055006

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is [X] agent [ ] common representative

and [X] has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.

[ ] is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.

[ ] is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

Arends, William Gerrit
Marks & Clek
90 Long Acre
London WC2E 9RA
United Kingdom

Telephone No.
020 7420 0000

Facsimile No.
020 7836 3339

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
18001

[ ] Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

[ ] the international application as originally filed

the description
- [X] as originally filed
- [ ] as amended under Article 34

the claims
- [ ] as originally filed
- [ ] as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)
- [X] as amended under Article 34

the drawings
- [X] as originally filed
- [ ] as amended under Article 34

2. [ ] The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. [ ] The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).

4. [ ] The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54*bis*.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English

- [X] which is the language in which the international application was filed.
- [ ] which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.
- [ ] which is the language of publication of the international application.
- [ ] which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

Sheet No. 3

International application No.
PCT/EP2008/055006

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

				For International Preliminary Examining Authority use only: received	not received
1. translation of international application	:		sheets	☐	☐
2. amendments under Article 34	:	4	sheets	☐	☐
3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	:		sheets	☐	☐
4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	:		sheets	☐	☐
5. letter	:	4	sheets	☐	☐
6. other *(specify)*	:		sheets	☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☐ original separate power of attorney
3. ☐ original general power of attorney
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
5. ☐ statement explaining lack of signature
6. ☐ sequence listing in computer readable form
7. ☐ tables in computer readable form related to a sequence listing
8. ☐ other *(specify)*:

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Willi Arends

Arends, William Gerrit

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
   ☐ The applicant has been informed accordingly.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.
6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54*bis*.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.
7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54*bis*.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.
8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54*bis*.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

Marks&Clerk LLP
Patent and Trade Mark Attorneys

London office
90 Long Acre, London WC2E 9RA
Tel: +44 (0)20 7420 0000 Fax: +44 (0)20 7836 3339
london@marks-clerk.com www.marks-clerk.com

EPO - Munich
67

22 April 2009

European Patent Office
Erhardtstr 27
D-80469 Munchen
Germany

please quote our reference WGA/G03578

your reference PCT/EP2008/055006

date 20 April 2009

Document : 1413533

Dear Sirs

RE: PCT Application No PCT/EP2008/055006
Novartis AG et al

We hereby request the rectification of two obvious mistakes under rule 91 PCT.

To this end, we are enclosing corrected page 51 of the description and corrected sheet 8 of the drawings, in triplicate, to be substituted for the corresponding pages currently on file.

The nature of the corrections is as follows.

On page 51 of the description, line 19 has been corrected so that the sentence reads, "A construct with only 4 cysteines is more likely to form correct disulfides and fewer covalent aggregates," (correction underlined). This mistake is obvious because it is stated that one of the aims of the patent application is to "eliminate or reduce the high molecular weight aggregates" (see page 1, lines 20 and 21) and it is stated in, for example, page 43, lines 10 to 13 of the description that, "Formation of covalent aggregates should be decreased for mutants with 4 cysteines as compared with Mycograb with 5 cysteines because no free cysteine in mutants with 4 cysteines is available after formation of intermolecular SS bridges". Thus it is clear that the statement on page 51, which is a conclusion of the results, should refer to "fewer" covalent aggregates.

The correction on sheet 8 of the Figures, is that the label of the peak at 9.8 mins has been corrected from "2" to "10". As is explained on page 12, lines 17 and 18 of the description, Figure 11, on sheet 8, conflates the results from Figures 7 and 8, so the traces shown in Figure 11 are the same as those in Figures 7 and 8, albeit normalised. It will be seen from Figures 7 and 8 that the only peak in Figures 7 and 8 at 9.8 mins is peak 4 in Figure 8 which corresponds to mutant MYC106. Therefore, it is obvious that the peak in Figure 11 should correctly be labelled "10" which the key indicates is the trace for the MYC106 mutant from Figure 8.

Marks & Clerk LLP is a limited liability partnership and is registered in England and Wales with registered number OC343273.
A list of members' names is open to inspection at our registered office, 90 Long Acre, London WC2E 9RA.
Marks & Clerk UK offices: Aberdeen Birmingham Cambridge Cheltenham Edinburgh Glasgow Leeds Leicester Liverpool London Manchester Oxford
Marks & Clerk affiliated overseas firms have offices in the following locations: Luxembourg Paris Hong Kong Singapore Beijing Shanghai Ottawa

It is therefore submitted that both corrections should be allowed under Rule 91 PCT.

Yours faithfully

Will Arends
for Marks & Clerk LLP

Enc

SH groups but only mutants Myc 118, Myc 119 and Myc 133 had a free SH group at T4, the location of the 5th cysteine which should remain reduced in the 'native' monomer. This is an indication that the SH group on the T4 peptide preferably forms SS bonds because all mutants with 5 cysteines gave signals for free SH groups but only in 3 of them a free SH group at T4 was detected.

MW determined with SEC HPLC is very dependent on the buffer matrix in the sample. A couple of SEC HPLC methods had to be established with a running buffer similar to the buffer of the sample. The matrix dependency of MW determination makes comparison of MW across process steps difficult (Table 10).

The UFDF experiment showed that NLS is to some extent retained in the sample solution and cannot efficiently be removed.

The results obtained with Pep Map of Mutants MYC C28Y +HIS, C28Y-HIS and MYC 137 were particularly promising. The results indicate that a mutant with a HIS tag and only 4 cysteines is particularly preferred. The HIS tag is required for purification with IMAC, a purification step of high efficiency. A construct with only 4 cysteines is more likely to form correct disulfides and fewer covalent aggregates.

<u>Effects of mutations</u>

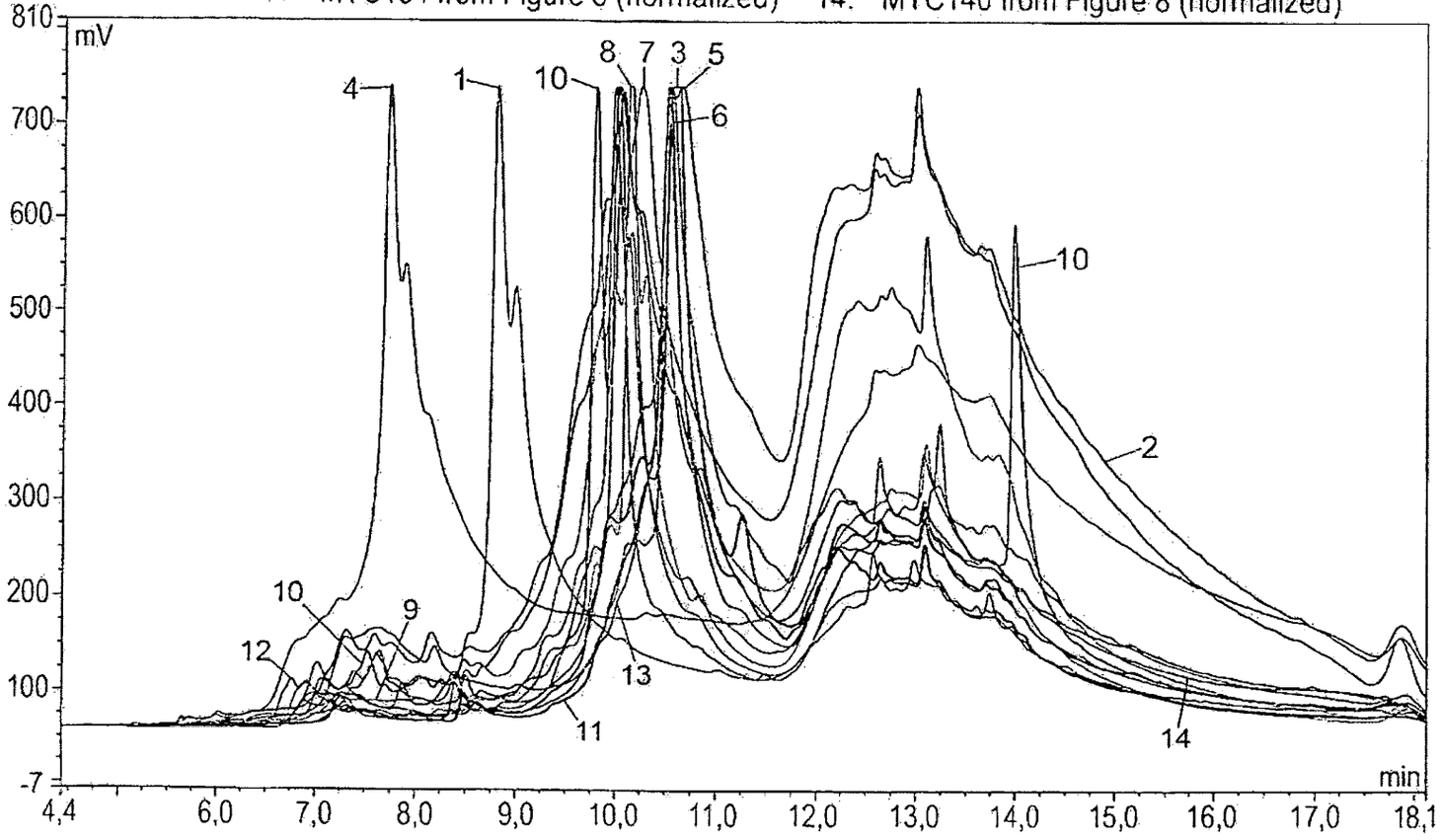
The most beneficial effect of the mutations can be attributed to the removal of the 5th cysteine. The number of correct disulfide bonds was increased compared with constructs with 5 cysteines. Additionally, solubility of the IBs was enhanced compared with constructs with 5 cysteines.

Exchanging the orientation of the heavy and light chain fragment had a minor effect on retention time in RPC 2 where the retention time decreased when the VL element was C terminal compared with an N-terminal orientation.

The tendency of the peptides to aggregate after NLS removal may be increased with the number of linker elements.

Fig.11

1. MYC116 from Figure 7 (normalized)
2. MYC118 from Figure 7 (normalized)
3. MYC119 from Figure 7 (normalized)
4. MYC130 from Figure 7 (normalized)
5. MYC133 from Figure 7 (normalized)
6. MYC135 from Figure 7 (normalized)
7. MYC134 from Figure 8 (normalized)
8. MYC137 from Figure 8 (normalized)
9. MYC138 from Figure 8 (normalized)
10. MYC106 from Figure 8 (normalized)
11. MYC136 from Figure 8 (normalized)
12. MYC139 from Figure 8 (normalized)
13. MYC123-ref from Figure 8 (normalized)
14. MYC140 from Figure 8 (normalized)



Marks&Clerk LLP
Patent and Trade Mark Attorneys

London office
90 Long Acre, London WC2E 9RA
Tel: +44 (0)20 7420 0000 Fax: +44 (0)20 7836 3339
london@marks-clerk.com www.marks-clerk.com

EPO - Munich
67

22. April 2009

European Patent Office
Erhardtstr 27
D-80469 Munchen
Germany

please quote our reference WGA/G03578

your reference PCT/EP2008/055006

date 20 April 2009

Document : 1413533

Dear Sirs

RE: PCT Application No PCT/EP2008/055006
Novartis AG et al

We hereby request the rectification of two obvious mistakes under rule 91 PCT.

To this end, we are enclosing corrected page 51 of the description and corrected sheet 8 of the drawings, in triplicate, to be substituted for the corresponding pages currently on file.

The nature of the corrections is as follows.

On page 51 of the description, line 19 has been corrected so that the sentence reads, "A construct with only 4 cysteines is more likely to form correct disulfides and fewer covalent aggregates," (correction underlined). This mistake is obvious because it is stated that one of the aims of the patent application is to "eliminate or reduce the high molecular weight aggregates" (see page 1, lines 20 and 21) and it is stated in, for example, page 43, lines 10 to 13 of the description that, "Formation of covalent aggregates should be decreased for mutants with 4 cysteines as compared with Mycograb with 5 cysteines because no free cysteine in mutants with 4 cysteines is available after formation of intermolecular SS bridges". Thus it is clear that the statement on page 51, which is a conclusion of the results, should refer to "fewer" covalent aggregates.

The correction on sheet 8 of the Figures, is that the label of the peak at 9.8 mins has been corrected from "2" to "10". As is explained on page 12, lines 17 and 18 of the description, Figure 11, on sheet 8, conflates the results from Figures 7 and 8, so the traces shown in Figure 11 are the same as those in Figures 7 and 8, albeit normalised. It will be seen from Figures 7 and 8 that the only peak in Figures 7 and 8 at 9.8 mins is peak 4 in Figure 8 which corresponds to mutant MYC106. Therefore, it is obvious that the peak in Figure 11 should correctly be labelled "10" which the key indicates is the trace for the MYC106 mutant from Figure 8.

Marks & Clerk LLP is a limited liability partnership and is registered in England and Wales with registered number OC343273.
A list of members' names is open to inspection at our registered office, 90 Long Acre, London WC2E 9RA.
Marks & Clerk UK offices: Aberdeen Birmingham Cambridge Cheltenham Edinburgh Glasgow Leeds Leicester Liverpool London Manchester Oxford
Marks & Clerk affiliated overseas firms have offices in the following locations: Luxembourg Paris Hong Kong Singapore Beijing Shanghai Ottawa

It is therefore submitted that both corrections should be allowed under Rule 91 PCT.

Yours faithfully

Will Arends
for Marks & Clerk LLP

Enc

SH groups but only mutants Myc 118, Myc 119 and Myc 133 had a free SH group at T4, the location of the 5th cysteine which should remain reduced in the 'native' monomer. This is an indication that the SH group on the T4 peptide preferably forms SS bonds because all mutants with 5 cysteines gave signals for free SH groups but only in 3 of them a free SH group at T4 was detected.

MW determined with SEC HPLC is very dependent on the buffer matrix in the sample. A couple of SEC HPLC methods had to be established with a running buffer similar to the buffer of the sample. The matrix dependency of MW determination makes comparison of MW across process steps difficult (Table 10).

The UFDF experiment showed that NLS is to some extent retained in the sample solution and cannot efficiently be removed.

The results obtained with Pep Map of Mutants MYC C28Y +HIS, C28Y-HIS and MYC 137 were particularly promising. The results indicate that a mutant with a HIS tag and only 4 cysteines is particularly preferred. The HIS tag is required for purification with IMAC, a purification step of high efficiency. A construct with only 4 cysteines is more likely to form correct disulfides and fewer covalent aggregates.

Effects of mutations

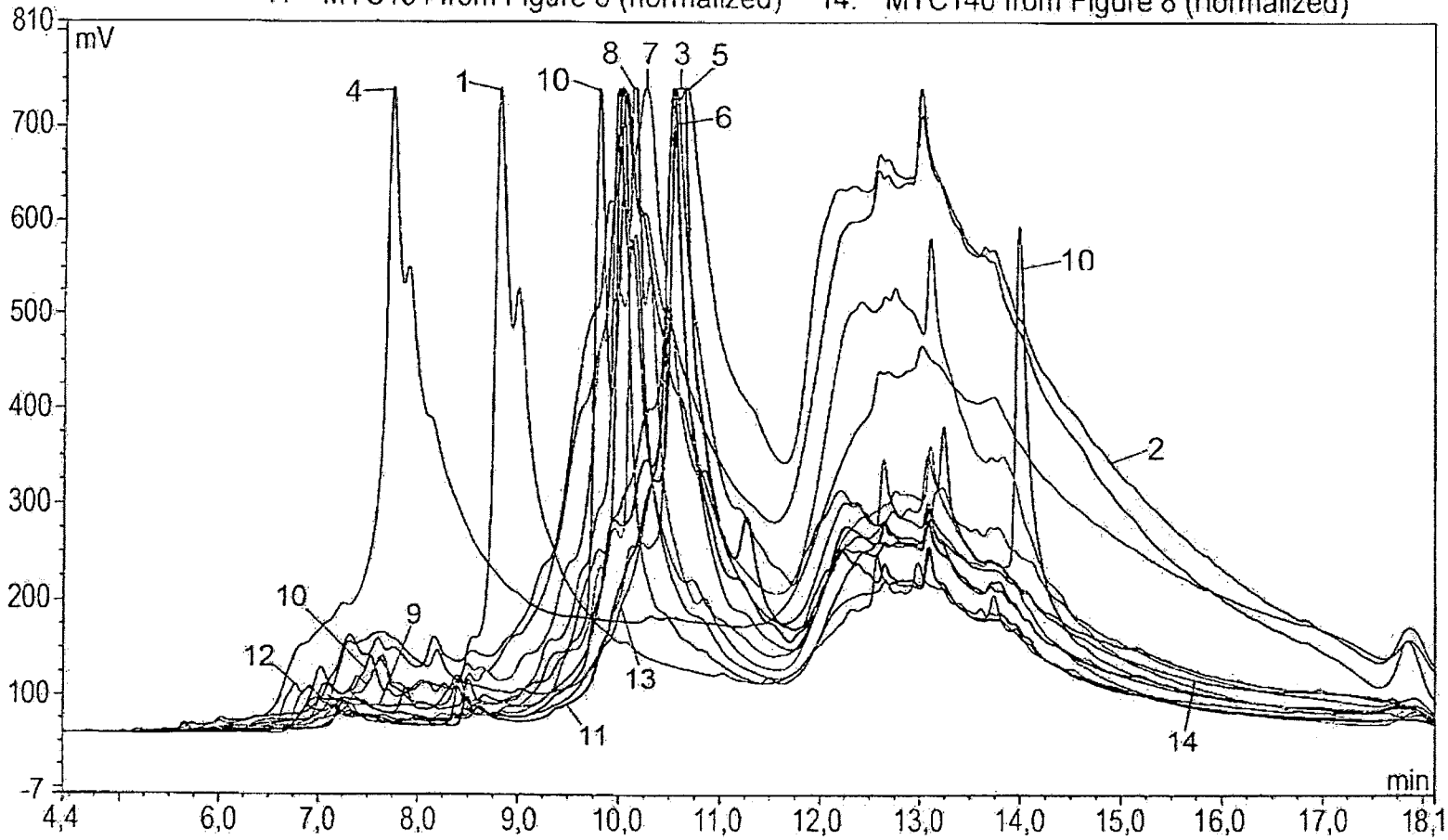
The most beneficial effect of the mutations can be attributed to the removal of the 5th cysteine. The number of correct disulfide bonds was increased compared with constructs with 5 cysteines. Additionally, solubility of the IBs was enhanced compared with constructs with 5 cysteines.

Exchanging the orientation of the heavy and light chain fragment had a minor effect on retention time in RPC 2 where the retention time decreased when the VL element was C terminal compared with an N-terminal orientation.

The tendency of the peptides to aggregate after NLS removal may be increased with the number of linker elements.

Fig.11

1. MYC116 from Figure 7 (normalized)
2. MYC118 from Figure 7 (normalized)
3. MYC119 from Figure 7 (normalized)
4. MYC130 from Figure 7 (normalized)
5. MYC133 from Figure 7 (normalized)
6. MYC135 from Figure 7 (normalized)
7. MYC134 from Figure 8 (normalized)
8. MYC137 from Figure 8 (normalized)
9. MYC138 from Figure 8 (normalized)
10. MYC106 from Figure 8 (normalized)
11. MYC136 from Figure 8 (normalized)
12. MYC139 from Figure 8 (normalized)
13. MYC123-ref from Figure 8 (normalized)
14. MYC140 from Figure 8 (normalized)



CLAIMS:

1. An scFv peptide comprising a V_H domain and a V_L domain linked by an amino acid spacer, wherein the V_H domain comprises the sequence of SEQ ID NO. 64 and the V_L domain comprises the sequence of SEQ ID NO. 66 and wherein the scFv peptide comprises the substitution or deletion of an amino acid in the V_H domain at the position corresponding to C_{28}.

2. An scFv peptide according to claim 1 wherein the substitution of the amino acid in the V_H domain is $C_{28}Y$.

3. An scFv peptide according to claim 1 or 2 wherein the amino acid spacer comprises the sequence $(GGGGS)_n$.

4. An scFv peptide according to any one of the preceding claims further comprising a purification tag, preferably a sequence of 6 histidine residues at the C-terminus.

5. An scFv peptide according to any one of the preceding claims comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO. 8, 10, 14, 18 and 22 wherein Xaa denotes an amino acid residue other than cysteine and wherein the N-terminal methionine residue may optionally be cleaved off, preferably wherein Xaa denotes a tyrosine residue.

6. A nucleic acid molecule comprising a sequence encoding an scFv peptide according to any one of the preceding claims.

7. A nucleic acid molecule according to claim 6 further comprising the sequence $(taa)_n$ located at the 3' end of the sequence encoding the scFv peptide wherein n is 1 or 2.

8. A nucleic acid molecule according to claim 6 or 7 wherein the molecule comprises a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO. 7, 9, 13, 17 and 21 wherein nnn denotes a codon coding for an amino acid other than a cysteine residue.

9. A nucleic acid molecule according to any one of claims 6 to 8 wherein the molecule is a DNA or RNA molecule.

10. A pharmaceutical composition comprising an scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 in combination with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier.

11. A combined preparation comprising an scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 and an antifungal agent or an anticancer agent.

12. A composition comprising an scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 and an antifungal agent or an anticancer agent.

13. A method of treating a patient with a fungal infection comprising administering to the patient an effective amount of an scFv peptide according to any one of claims 1 to 5.

14. A method according to claim 13 further comprising the step of administering to the patient an effective amount of an antifungal agent.

15. An scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 for use in the treatment of a fungal infection.

16. The method according to claim 14 or 15 or the scFv peptide according to claim 15 wherein the fungal infection is due to a Candida, Cryptococcus, Histoplasma, Aspergillus, Torulopsis, Mucormycosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis or Paracoccidioidomycosis organism.

17. The combined preparation according to claim 11, the composition according to claim 12, the method according to claim 13, 14 or 16 or the scFv peptide according to claim 15 or 16 wherein the antifungal agent is an azole antifungal, preferably selected from the group consisting of: itraconazole, voriconazole isavuconazole, fluconazole, miconazole, ketoconazole, and posaconazole.

18. The combined preparation according to claim 11, the composition according to claim 12, the method according to claim 13, 14 or 16 or the scFv peptide according to claim 14 or 16 wherein the antifungal agent is selected from the group consisting of: a polyene antifungal agent and an echinocandin antifungal agent.

19. The combined preparation, composition, method or scFv peptide according to claim 18 wherein the polyene antifungal agent comprises amphotericin B or a derivative thereof.

20. A method of treating a patient with a cancer disease comprising administering to the patient in need an effective amount of a scFv peptide according to any one of claims 1 to 5.

21. A method according to claim 20 further comprising the step of administering to the patient an effective amount of at least one other anticancer agent.

22. An scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 for use in the treatment of a cancer disease.

23. The combined preparation according to claim 11, the composition according to claim 12, the method according to claim 20 or 21 or the scFv peptide according to claim 22 wherein the anticancer agent is selected from the group consisting of: Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Herceptin, Docetaxel, Cisplatin, Imatinib, Paclitaxel, Docetaxel, Hydroxyurea, 5-fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan, Cytarabine and Raltitrexed.

123

24. A method of treating a patient with of a condition involving raised levels of TNFα and/or IL-6 comprising administering to the patient an effective amount of a scFv peptide according to any one of claims 1 to 5.

25. An scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 for use in the treatment of a condition involving raised levels of TNFα and/or IL-6.

26. A method according to claim 24 or an scFv peptide according to claim 25 wherein the condition involving raised levels of TNFα and/or IL-6 is selected from the group consisting of: sepsis, SIRS and an autoimmune disease.

27. A method or scFv peptide according to claim 26 wherein the autoimmune disease is selected from the group consisting of: Crohn's disease, rheumatoid arthritis, ulcerative colitis and systemic lupus erythematosus.

28. A vector molecule comprising a nucleotide sequence according to any one of claims 6 to 9.

29. A host cell comprising a vector molecule according to claim 28.

30. A method for producing a scFv peptide according to any one of claims 1 to 5 which comprises culturing a host cell having incorporated therein an expression vector containing, under control of suitable transcriptional control elements, a nucleic acid molecule according to any one of claims 6 to 9 under conditions sufficient for expression of said peptides in the host cell thereby causing the production of said peptide and recovering the peptide produced by said cell.

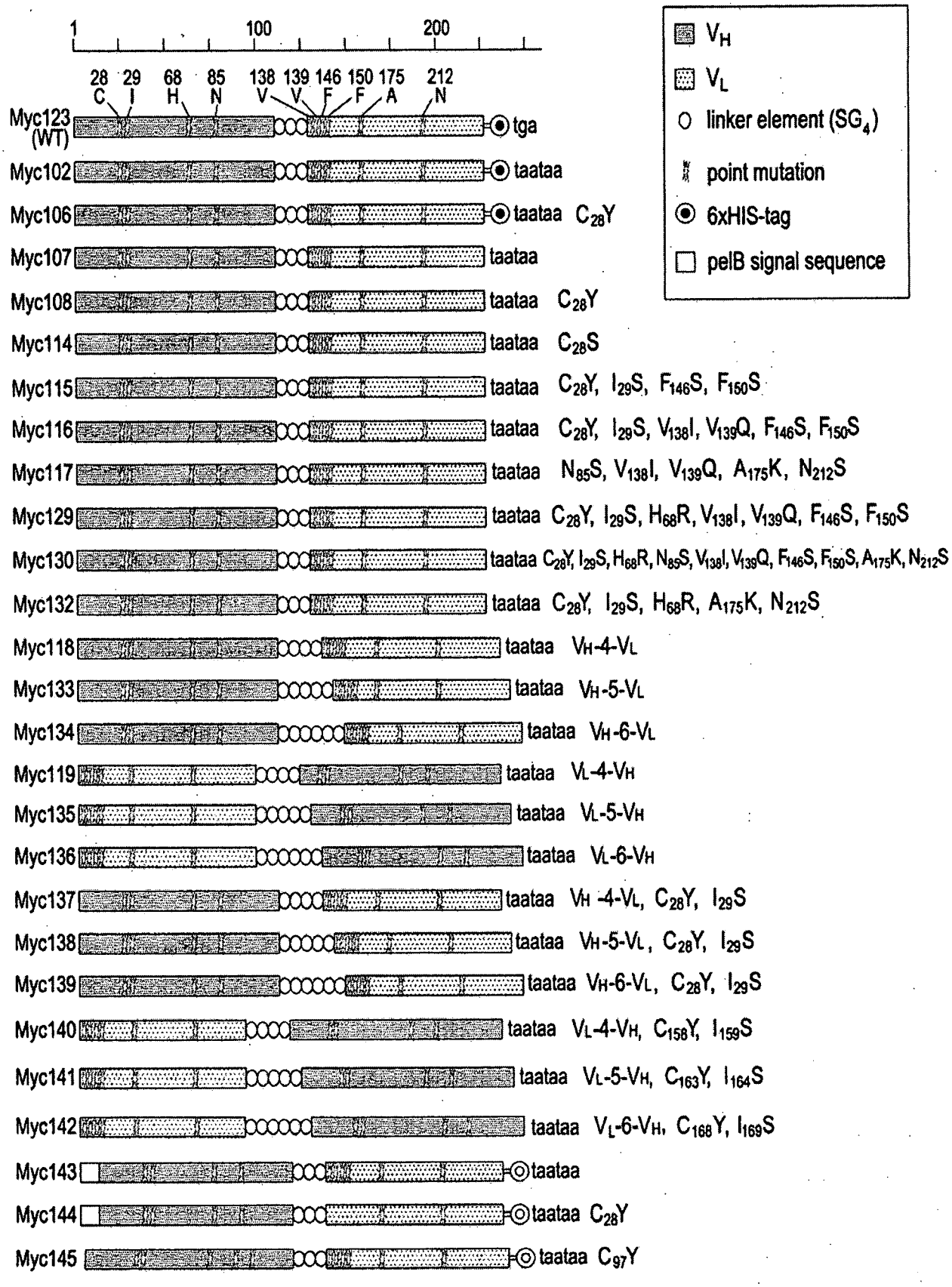

1
100
200
28 C
29 I
68 H
85 N
138 V
139 V
146 F
150 F
175 A
212 N
V_H
V_L
linker element (SG_4)
point mutation
6xHIS-tag
pelB signal sequence
Myc123 (WT) tga
Myc102 taataa
Myc106 taataa $C_{28}Y$
Myc107 taataa
Myc108 taataa $C_{28}Y$
Myc114 taataa $C_{28}S$
Myc115 taataa $C_{28}Y$, $I_{29}S$, $F_{146}S$, $F_{150}S$
Myc116 taataa $C_{28}Y$, $I_{29}S$, $V_{138}I$, $V_{139}Q$, $F_{146}S$, $F_{150}S$
Myc117 taataa $N_{85}S$, $V_{138}I$, $V_{139}Q$, $A_{175}K$, $N_{212}S$
Myc129 taataa $C_{28}Y$, $I_{29}S$, $H_{68}R$, $V_{138}I$, $V_{139}Q$, $F_{146}S$, $F_{150}S$
Myc130 taataa $C_{28}Y$, $I_{29}S$, $H_{68}R$, $N_{85}S$, $V_{138}I$, $V_{139}Q$, $F_{146}S$, $F_{150}S$, $A_{175}K$, $N_{212}S$
Myc132 taataa $C_{28}Y$, $I_{29}S$, $H_{68}R$, $A_{175}K$, $N_{212}S$
Myc118 taataa V_H-4-V_L
Myc133 taataa V_H-5-V_L
Myc134 taataa V_H-6-V_L
Myc119 taataa V_L-4-V_H
Myc135 taataa V_L-5-V_H
Myc136 taataa V_L-6-V_H
Myc137 taataa V_H-4-V_L, $C_{28}Y$, $I_{29}S$
Myc138 taataa V_H-5-V_L, $C_{28}Y$, $I_{29}S$
Myc139 taataa V_H-6-V_L, $C_{28}Y$, $I_{29}S$
Myc140 taataa V_L-4-V_H, $C_{158}Y$, $I_{159}S$
Myc141 taataa V_L-5-V_H, $C_{163}Y$, $I_{164}S$
Myc142 taataa V_L-6-V_H, $C_{168}Y$, $I_{169}S$
Myc143 taataa
Myc144 taataa $C_{28}Y$
Myc145 taataa $C_{97}Y$

Fig. 1

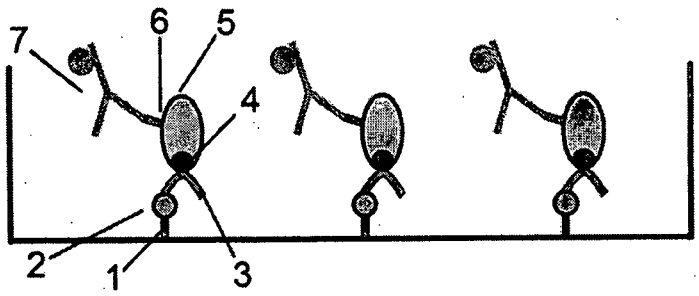

7
6
5
4
2
1
3

Fig. 2

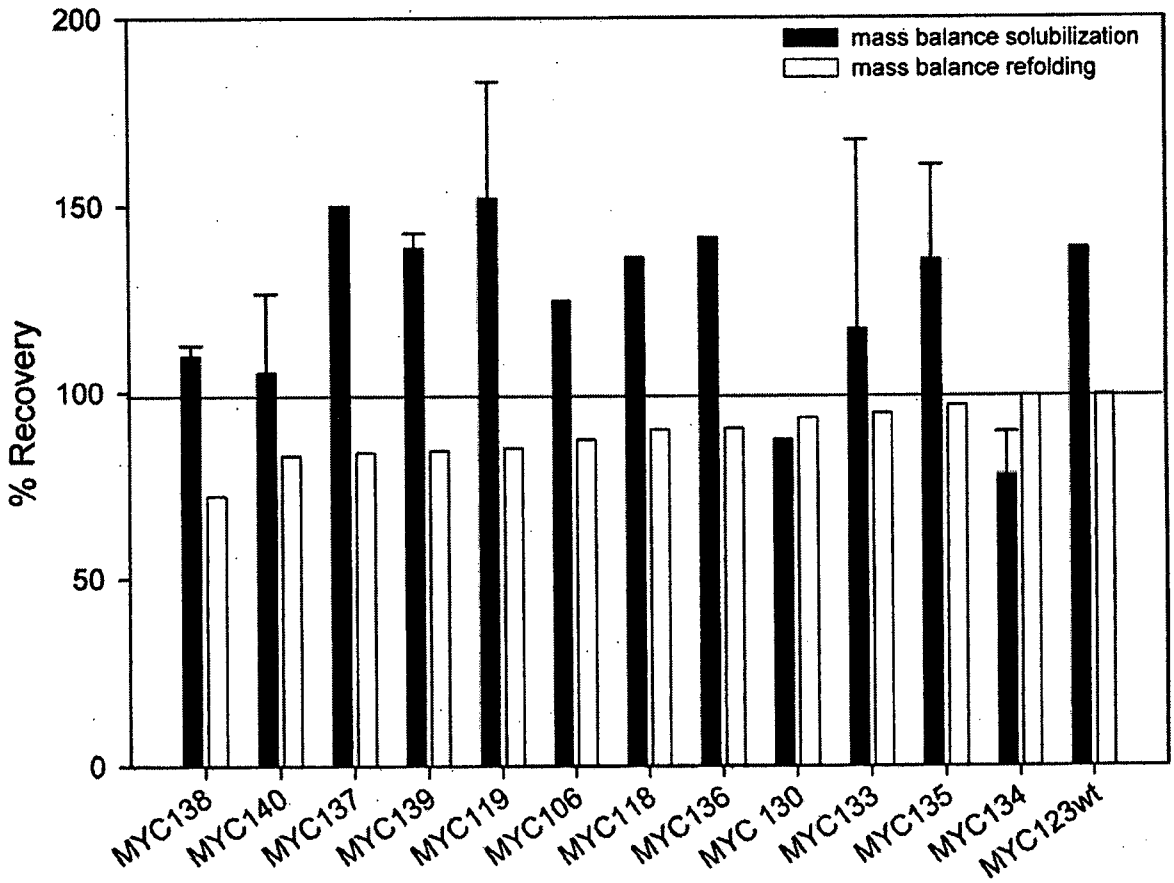
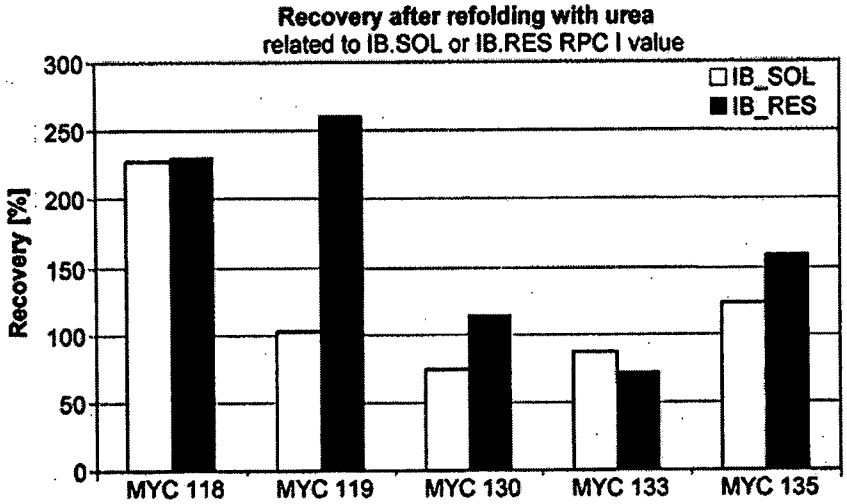

mass balance solubilization
mass balance refolding
% Recovery
200
150
100
50
0
MYC138
MYC140
MYC137
MYC139
MYC119
MYC106
MYC118
MYC136
MYC 130
MYC133
MYC135
MYC134
MYC123wt

Fig. 3

A


Recovery after refolding with urea
related to IB.SOL or IB.RES RPC I value
IB_SOL
IB_RES
Recovery [%]
300
250
200
150
100
50
0
MYC 118
MYC 119
MYC 130
MYC 133
MYC 135

B

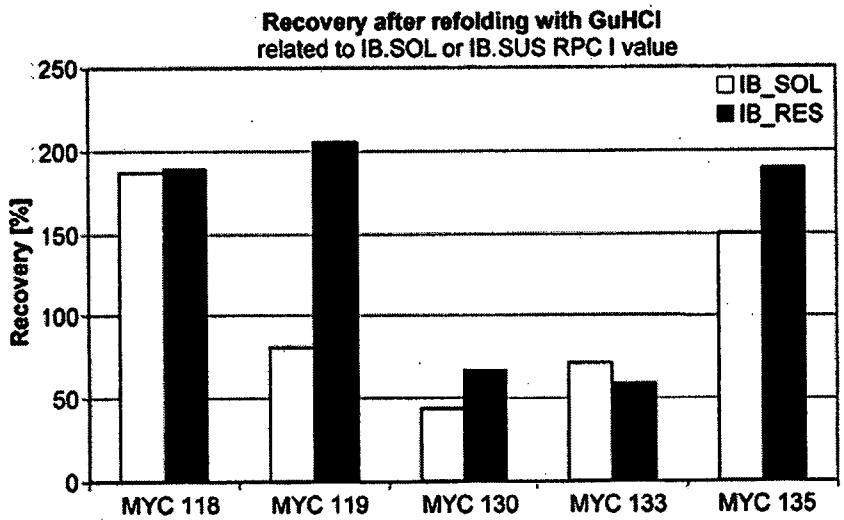

Recovery after refolding with GuHCl
related to IB.SOL or IB.SUS RPC I value
IB_SOL
IB_RES
Recovery [%]
250
200
150
100
50
0
MYC 118
MYC 119
MYC 130
MYC 133
MYC 135

Fig. 4

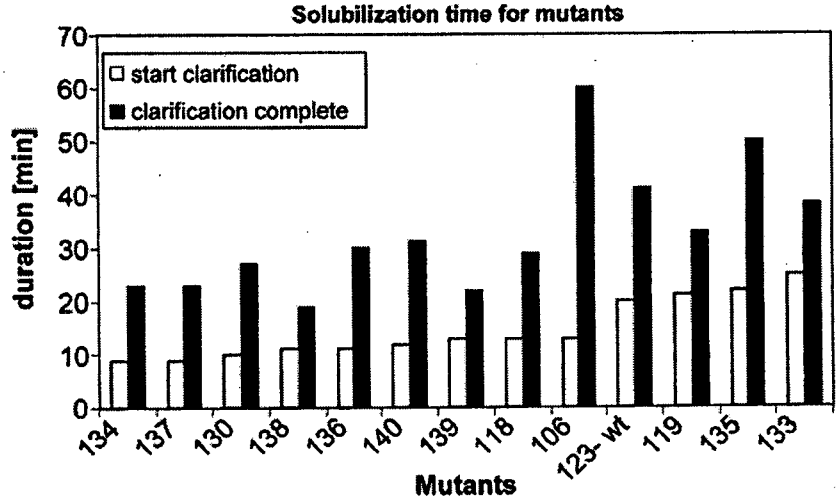

Solubilization time for mutants
start clarification
clarification complete
duration [min]
70
60
50
40
30
20
10
0
134
137
130
138
136
140
139
118
106
123- wt
119
135
133
Mutants

Fig. 5

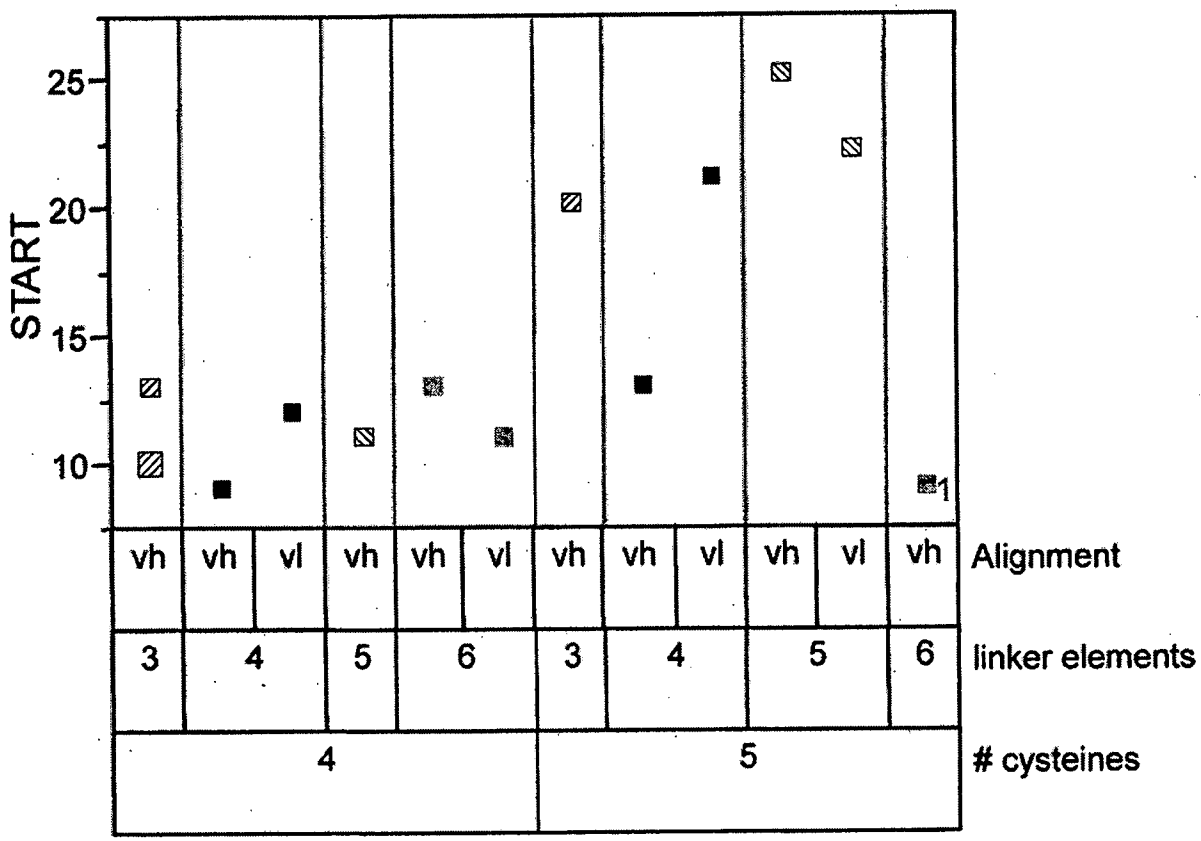

25
20
15
10
START
1
vh
vh
vl
vh
vh
vl
vh
vh
vl
vh
vl
vh
Alignment
3
4
5
6
3
4
5
6
linker elements
4
5
cysteines

Fig. 6

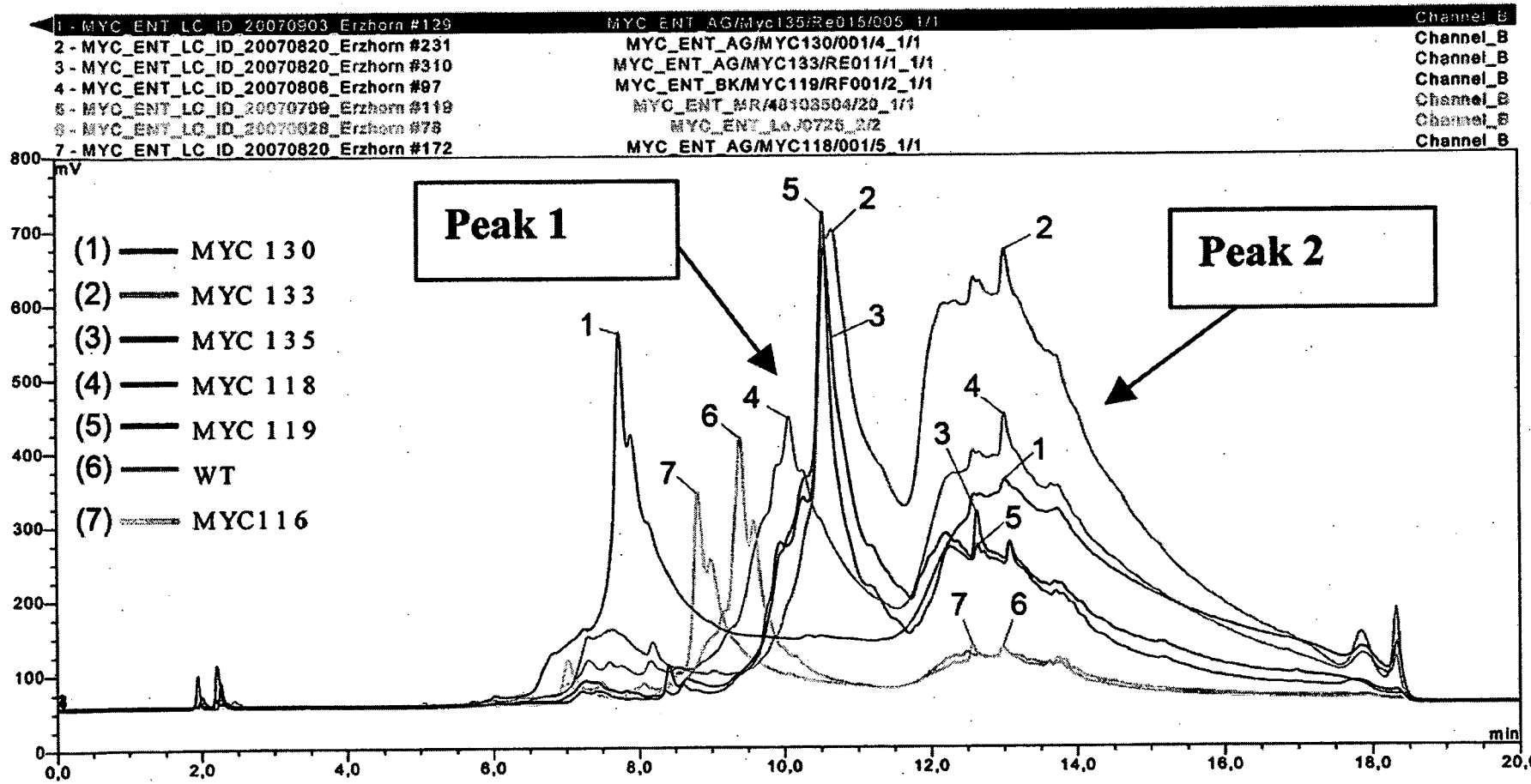

1 - MYC_ENT_LC_ID_20070903_Erzhorn #129 MYC_ENT_AG/Myc135/Re015/005_1/1 Channel_B
2 - MYC_ENT_LC_ID_20070820_Erzhorn #231 MYC_ENT_AG/MYC130/001/4_1/1 Channel_B
3 - MYC_ENT_LC_ID_20070820_Erzhorn #310 MYC_ENT_AG/MYC133/RE011/1_1/1 Channel_B
4 - MYC_ENT_LC_ID_20070806_Erzhorn #97 MYC_ENT_BK/MYC119/RF001/2_1/1 Channel_B
5 - MYC_ENT_LC_ID_20070709_Erzhorn #119 MYC_ENT_MR/48103504/20_1/1 Channel_B
6 - MYC_ENT_LC_ID_20070628_Erzhorn #78 MYC_ENT_LeJ0726_2/2 Channel_B
7 - MYC_ENT_LC_ID_20070820_Erzhorn #172 MYC_ENT_AG/MYC118/001/5_1/1 Channel_B
mV
800
700
600
500
400
300
200
100
0
(1) MYC 130
(2) MYC 133
(3) MYC 135
(4) MYC 118
(5) MYC 119
(6) WT
(7) MYC116
Peak 1
Peak 2
1
2
3
4
5
6
7
min
0,0
2,0
4,0
6,0
8,0
10,0
12,0
14,0
16,0
18,0
20,0

Fig. 7

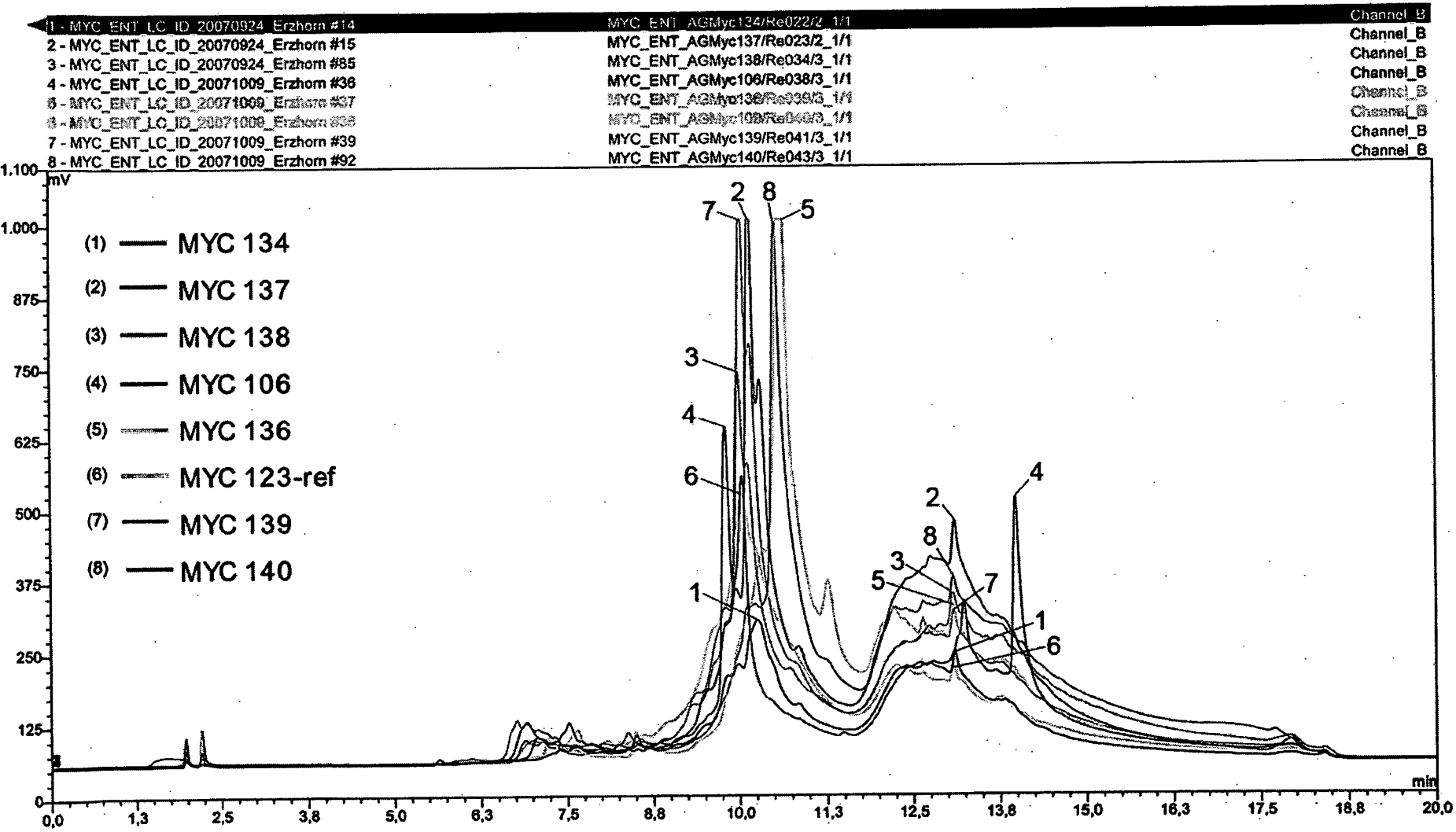

1 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #14
2 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #15
3 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #85
4 - MYC_ENT_LC_ID_20071009_Erzhorn #36
7 - MYC_ENT_LC_ID_20071009_Erzhorn #39
8 - MYC_ENT_LC_ID_20071009_Erzhorn #92
MYC_ENT_AGMyc137/Re023/2_1/1
MYC_ENT_AGMyc138/Re034/3_1/1
MYC_ENT_AGMyc106/Re038/3_1/1
MYC_ENT_AGMyc139/Re041/3_1/1
MYC_ENT_AGMyc140/Re043/3_1/1
Channel_B
mV
1.100
1.000
875
750
625
500
375
250
125
0
(1) MYC 134
(2) MYC 137
(3) MYC 138
(4) MYC 106
(5) MYC 136
(6) MYC 123-ref
(7) MYC 139
(8) MYC 140
min
0,0
1,3
2,5
3,8
5,0
6,3
7,5
8,8
10,0
11,3
12,5
13,8
15,0
16,3
17,5
18,8
20,0

Fig. 8

Scaled Estimates

Nominal factors expanded to all levels

Continuous factors centred by mean, scaled by range/2

Term	Scaled Estimate	Std Error	t Ratio	Prob>|t|
Intercept	10,339265	0,055599	185,96	<,0001*
linker length	0,1344474	0,076476	1,76	0,1168
cysteines	0,0928026	0,052553	1,77	0,1154
arrangement[VH]	-0,209796	0,055923	-3,75	0,0056*
arrangement[VL]	0,2097961	0,055923	3,75	0,0056*

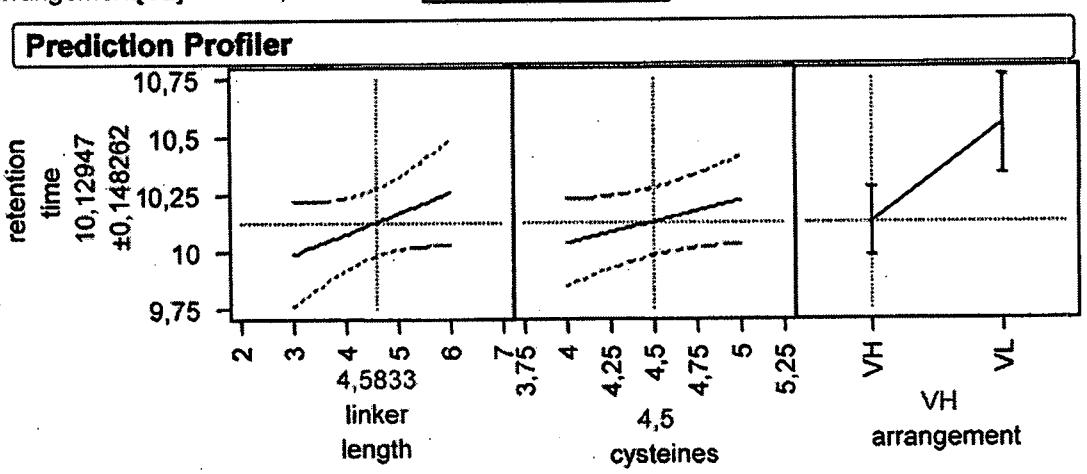


Fig. 9

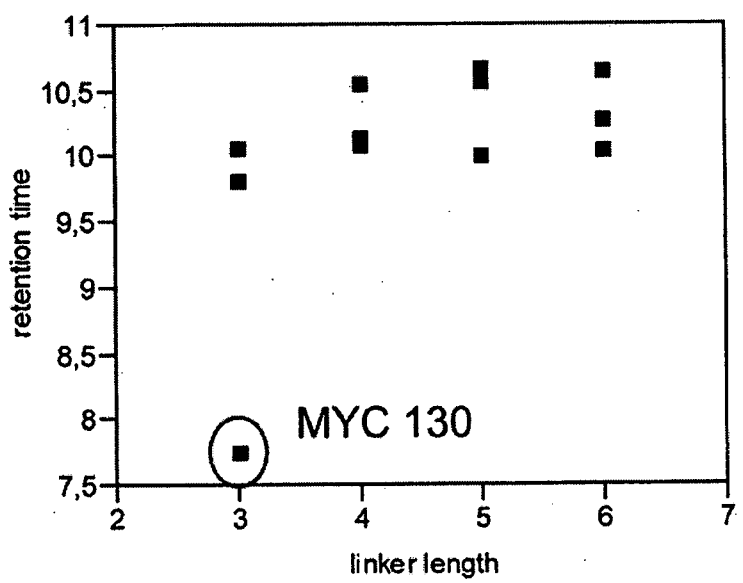


Fig. 10

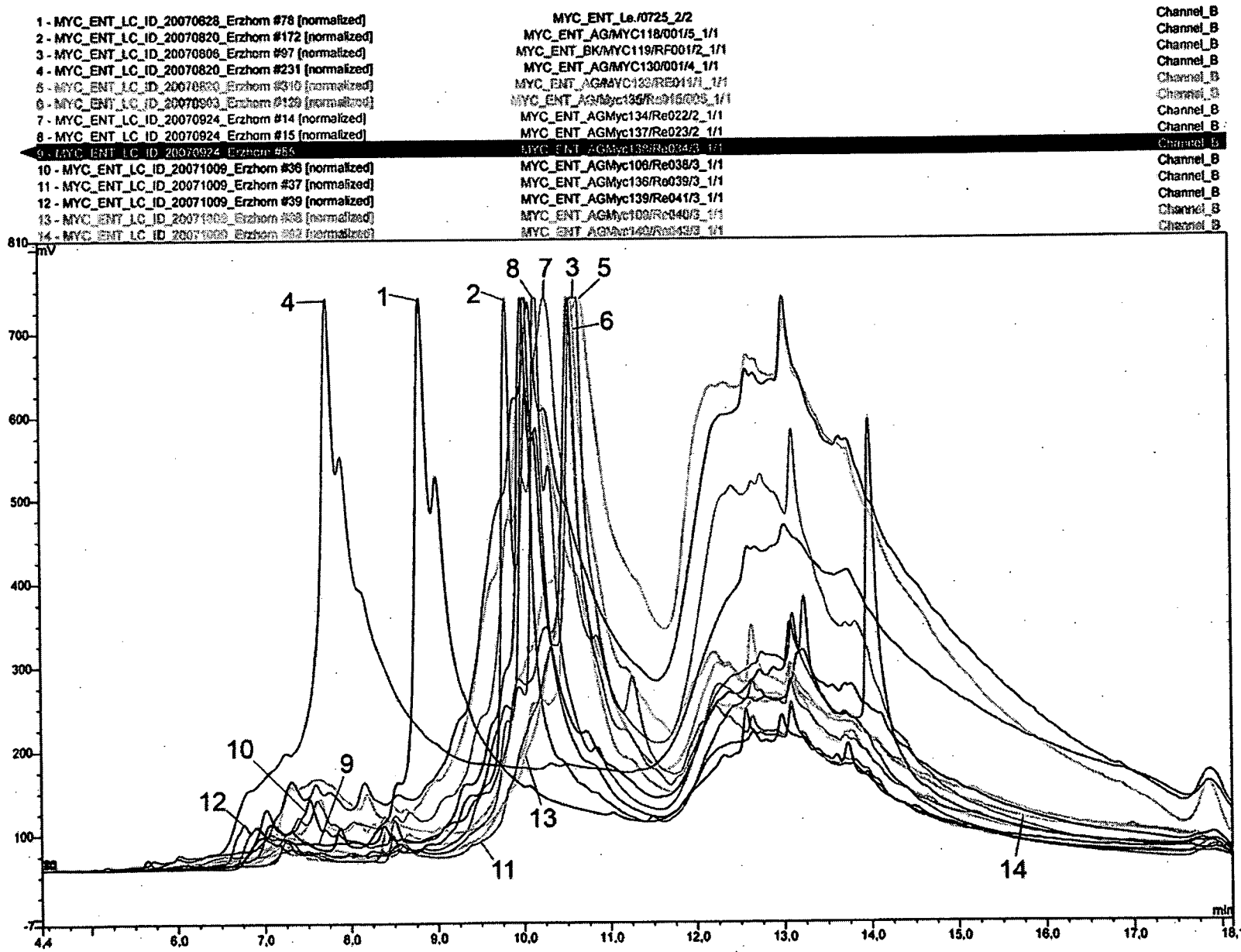

1 - MYC_ENT_LC_ID_20070628_Erzhorn #78 [normalized]
2 - MYC_ENT_LC_ID_20070820_Erzhorn #172 [normalized]
3 - MYC_ENT_LC_ID_20070806_Erzhorn #97 [normalized]
4 - MYC_ENT_LC_ID_20070820_Erzhorn #231 [normalized]
7 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #14 [normalized]
8 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #15 [normalized]
9 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #55
10 - MYC_ENT_LC_ID_20071009_Erzhorn #36 [normalized]
11 - MYC_ENT_LC_ID_20071009_Erzhorn #37 [normalized]
12 - MYC_ENT_LC_ID_20071009_Erzhorn #39 [normalized]
MYC_ENT_Le./0725_2/2
MYC_ENT_AG/MYC118/001/5_1/1
MYC_ENT_BK/MYC119/RF001/2_1/1
MYC_ENT_AG/MYC130/001/4_1/1
MYC_ENT_AG/Myc134/Re022/2_1/1
MYC_ENT_AG/Myc137/Re023/2_1/1
MYC_ENT_AG/Myc106/Re038/3_1/1
MYC_ENT_AG/Myc136/Re039/3_1/1
MYC_ENT_AG/Myc139/Re041/3_1/1
Channel_B
mV
810
700
600
500
400
300
200
100
4,4
6,0
7,0
8,0
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,1
min
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

Fig. 11

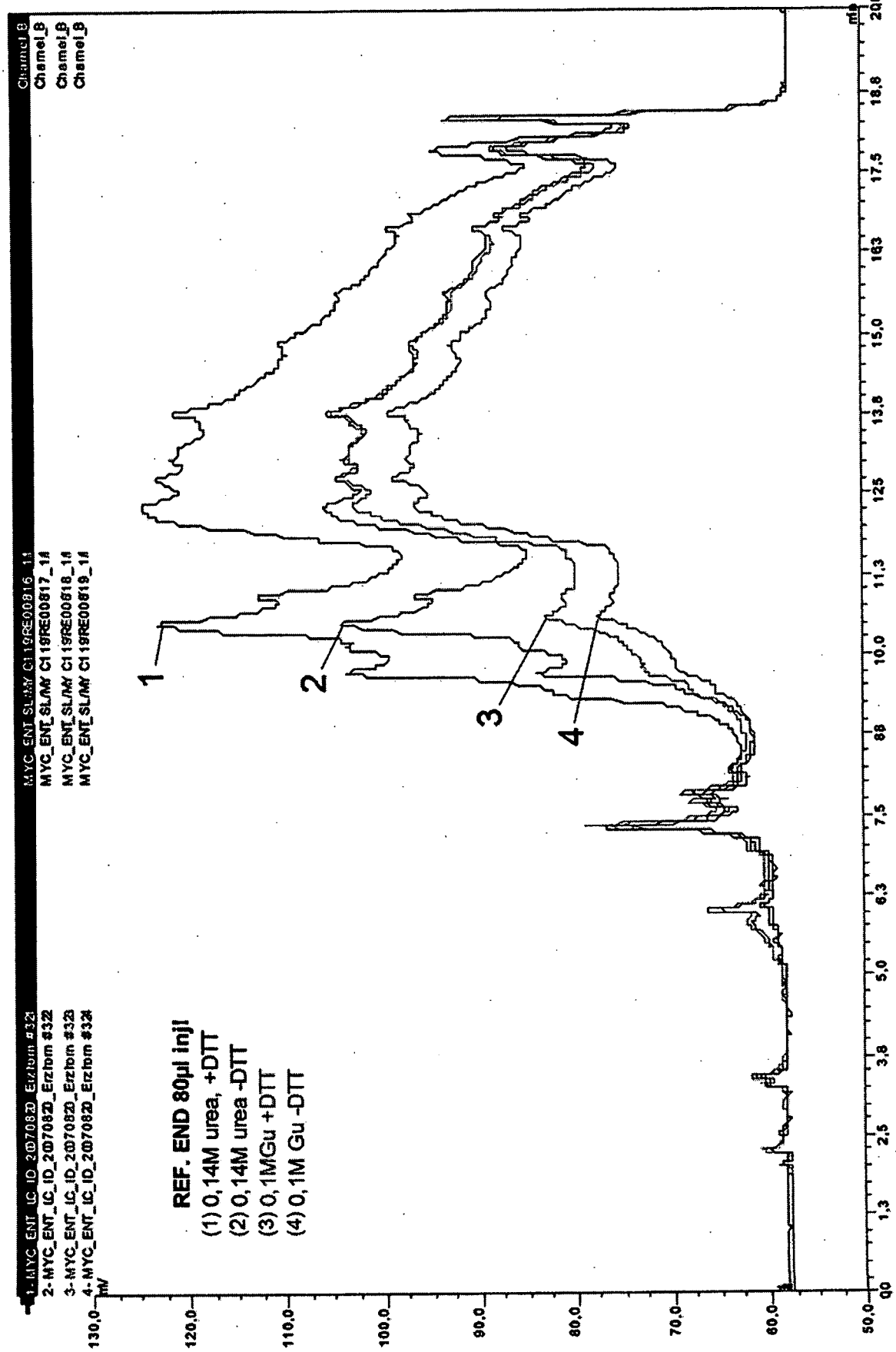

REF. END 80µl inj
(1) 0,14M urea, +DTT
(2) 0,14M urea -DTT
(3) 0,1MGu +DTT
(4) 0,1M Gu -DTT
1
2
3
4
mV
min

Fig. 12

432

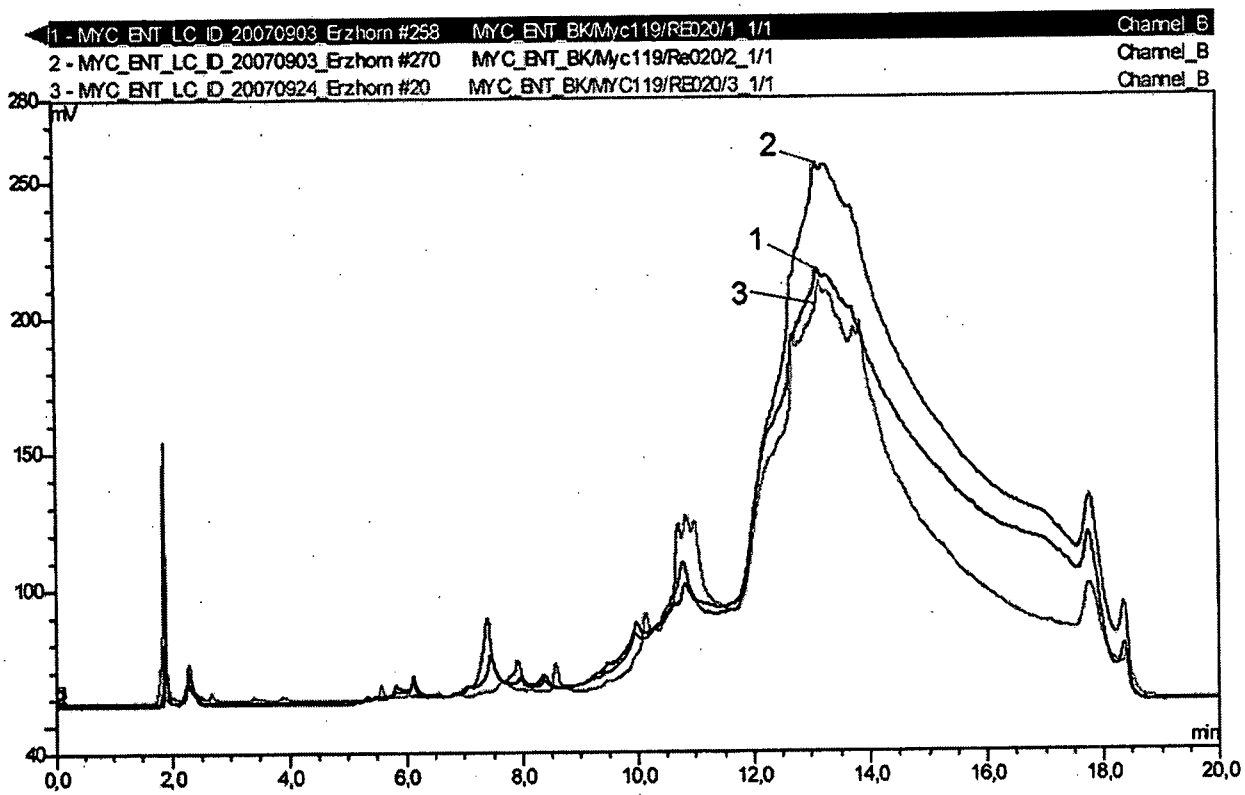

1 - MYC_ENT_LC_ID_20070903_Erzhorn #258 MYC_ENT_BK/Myc119/RED20/1_1/1 Channel_B
2 - MYC_ENT_LC_ID_20070903_Erzhorn #270 MYC_ENT_BK/Myc119/Re020/2_1/1 Channel_B
3 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #20 MYC_ENT_BK/MYC119/RED20/3_1/1 Channel_B
mV
280
250
200
150
100
40
2
1
3
min
0,0
2,0
4,0
6,0
8,0
10,0
12,0
14,0
16,0
18,0
20,0

Fig. 13

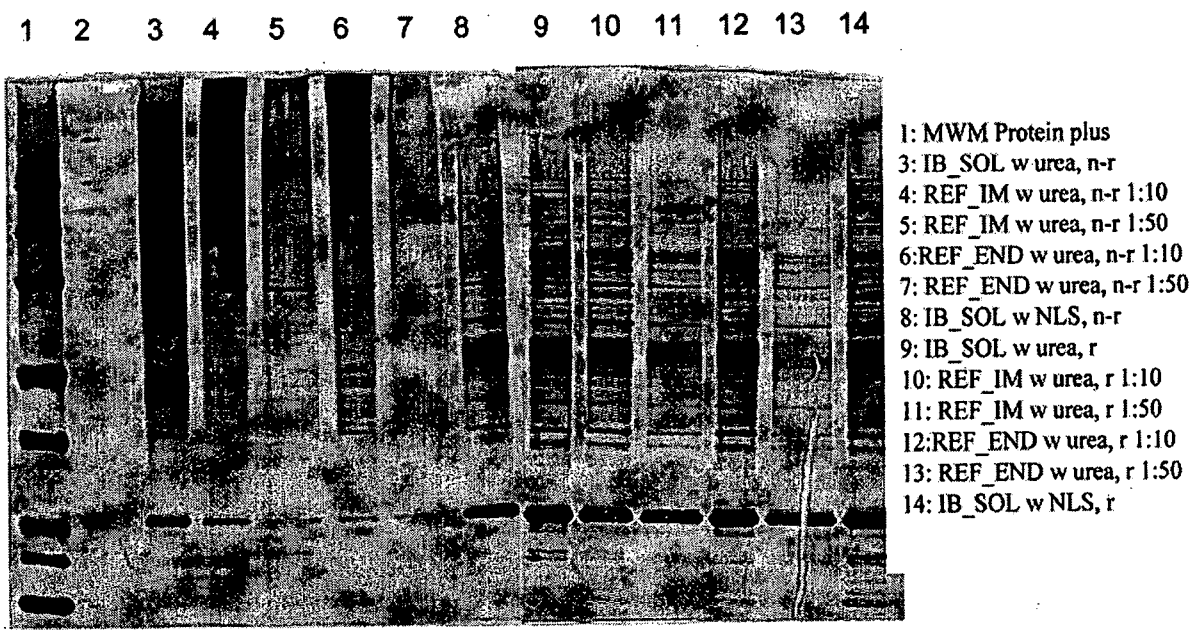

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
1: MWM Protein plus
3: IB_SOL w urea, n-r
4: REF_IM w urea, n-r 1:10
5: REF_IM w urea, n-r 1:50
6:REF_END w urea, n-r 1:10
7: REF_END w urea, n-r 1:50
8: IB_SOL w NLS, n-r
9: IB_SOL w urea, r
10: REF_IM w urea, r 1:10
11: REF_IM w urea, r 1:50
12:REF_END w urea, r 1:10
13: REF_END w urea, r 1:50
14: IB_SOL w NLS, r

Fig. 14

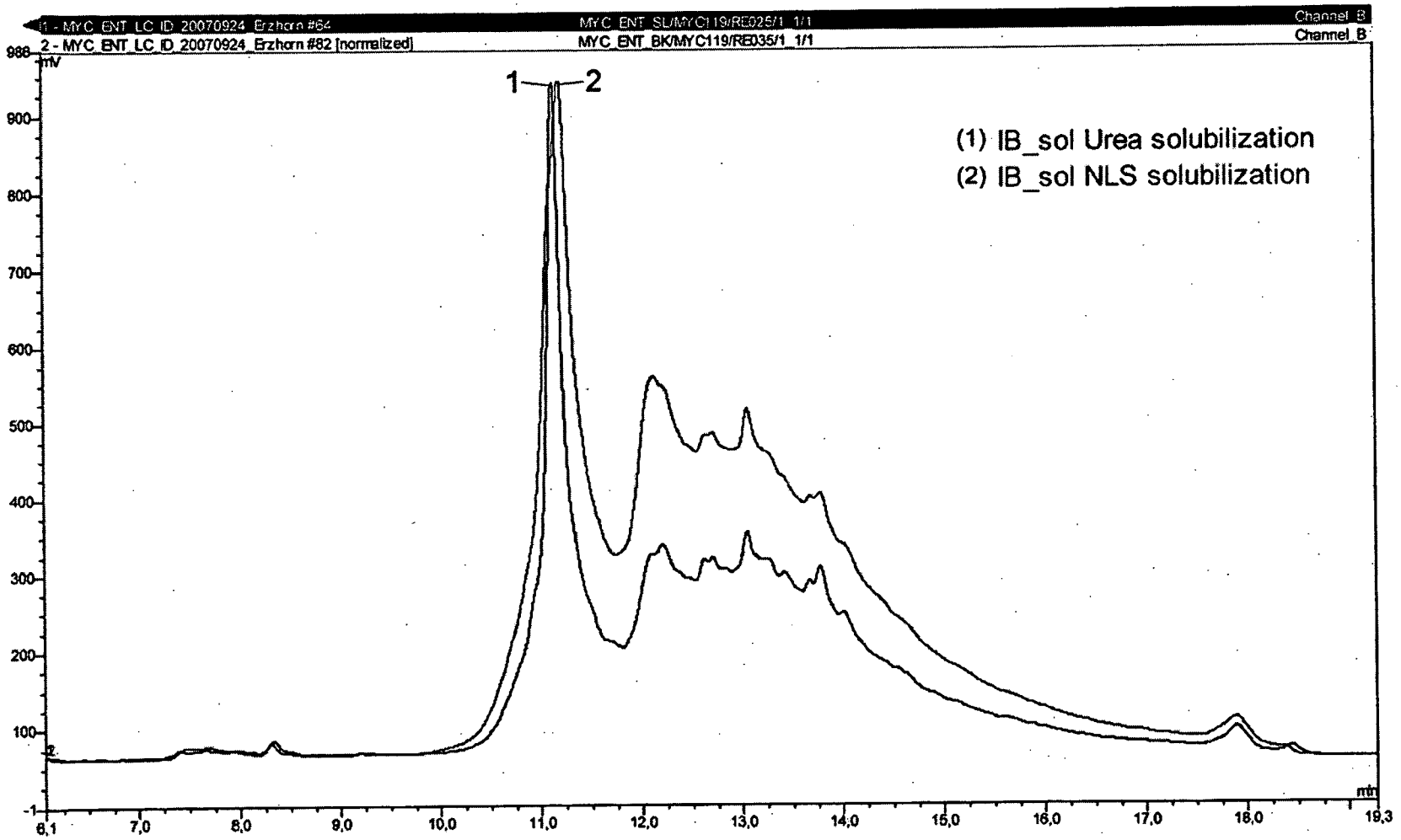
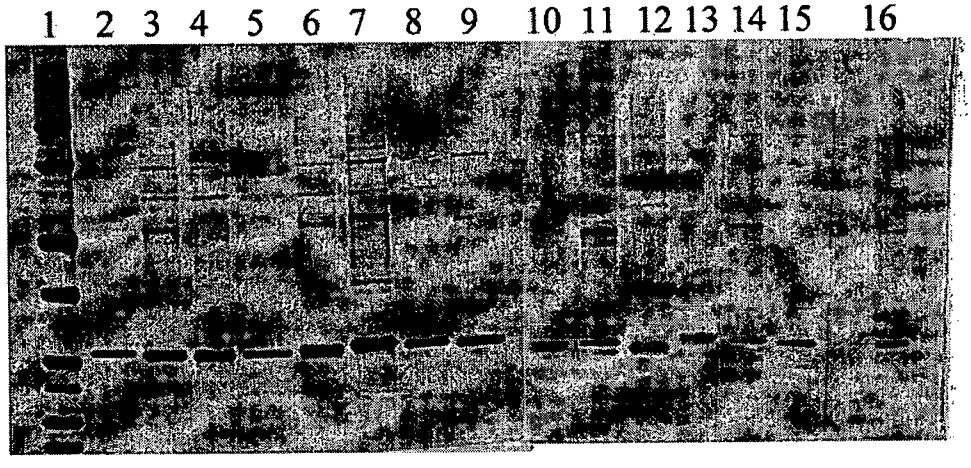

1 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #64
2 - MYC_ENT_LC_ID_20070924_Erzhorn #82 [normalized]
MYC_ENT_SL/MYC119/RE025/1_1/1
MYC_ENT_BK/MYC119/RE035/1_1/1
Channel_B
Channel_B
mV
988
900
800
700
600
500
400
300
200
100
-1
1
2
(1) IB_sol Urea solubilization
(2) IB_sol NLS solubilization
6,1
7,0
8,0
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,3
min

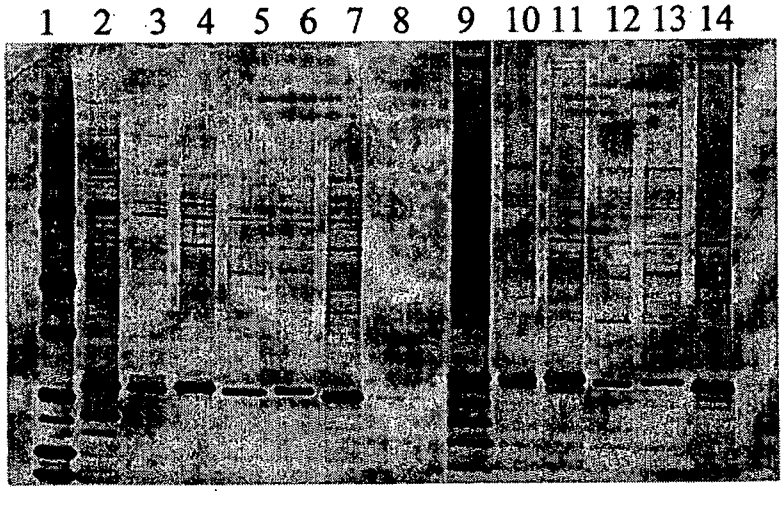
Fig. 15

434.



1: MWM Protein$_{plus}$ 2: Reference Biomeva
3: MYC 118, r 10: MYC 118,n-r
4: MYC 119; r 11: MYC 119 n-r
5: MYC 130; r 12: MYC 133 n-r
6: MYC 133; r 13: MYC 134 n-r
7: MYC 134; r 14: MYC 135 n-r
8: MYC 135; r 15: MYC 137 n-r
9: MYC 137, r 16: MYC 130 n-r

Fig. 16



1: MWM Protein plus
2: MYC 106$_{origami}$ r9: MYC 106,n-r
3: MYC 123; r10: MYC 123n-r
4: MYC 136; r11: MYC 136 n-r
5: MYC 138; r12: MYC 138 n-r
6: MYC 139; r13: MYC 139 n-r
7: MYC 140; r14: MYC 140 n-r

Fig. 17

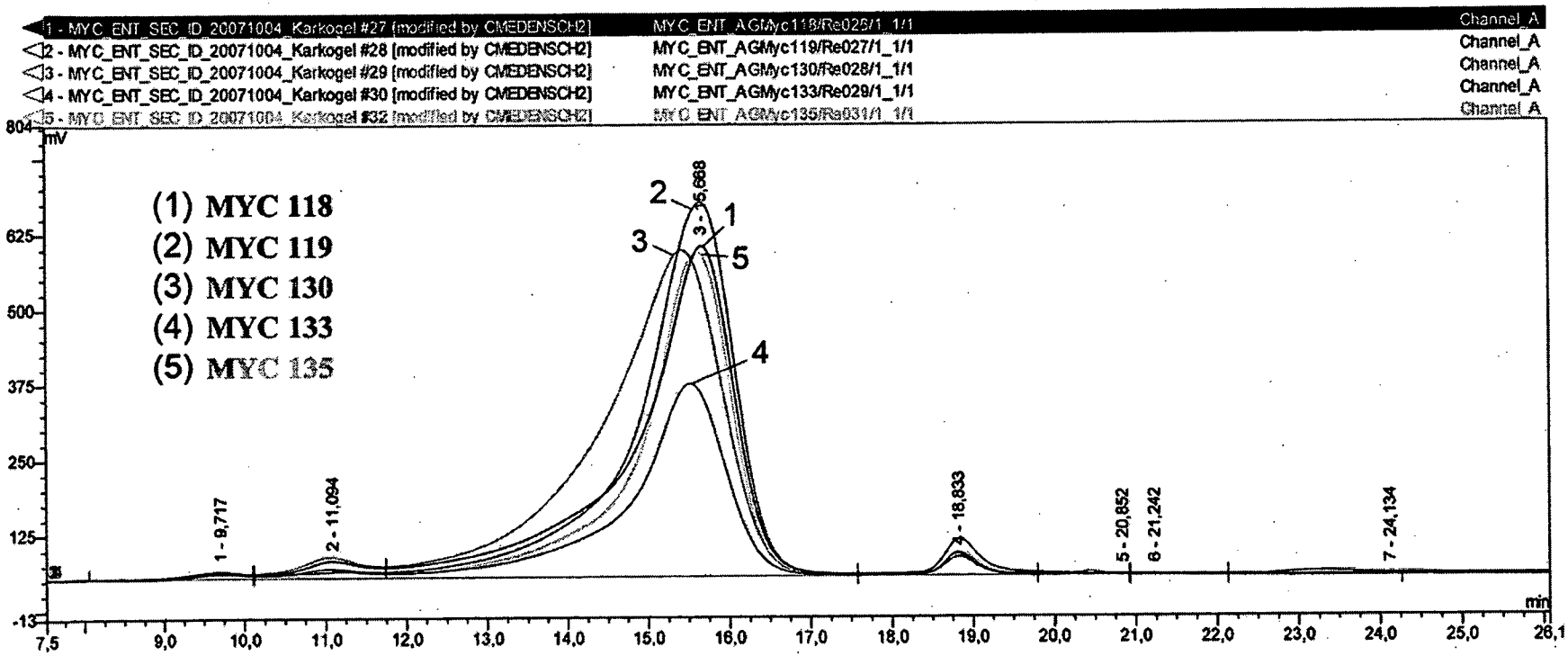

1 - MYC_ENT_SEC_ID_20071004_Karkogel #27 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc118/Re026/1_1/1 Channel_A
2 - MYC_ENT_SEC_ID_20071004_Karkogel #28 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc119/Re027/1_1/1 Channel_A
3 - MYC_ENT_SEC_ID_20071004_Karkogel #29 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc130/Re028/1_1/1 Channel_A
4 - MYC_ENT_SEC_ID_20071004_Karkogel #30 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc133/Re029/1_1/1 Channel_A
5 - MYC_ENT_SEC_ID_20071004_Karkogel #32 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc135/Re031/1_1/1
mV
804
625
500
375
250
125
-13
(1) MYC 118
(2) MYC 119
(3) MYC 130
(4) MYC 133
(5) MYC 135
1 - 9,717
2 - 11,094
3 - 15,668
4 - 18,833
5 - 20,852
6 - 21,242
7 - 24,134
min
7,5
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,1

Fig. 18

436

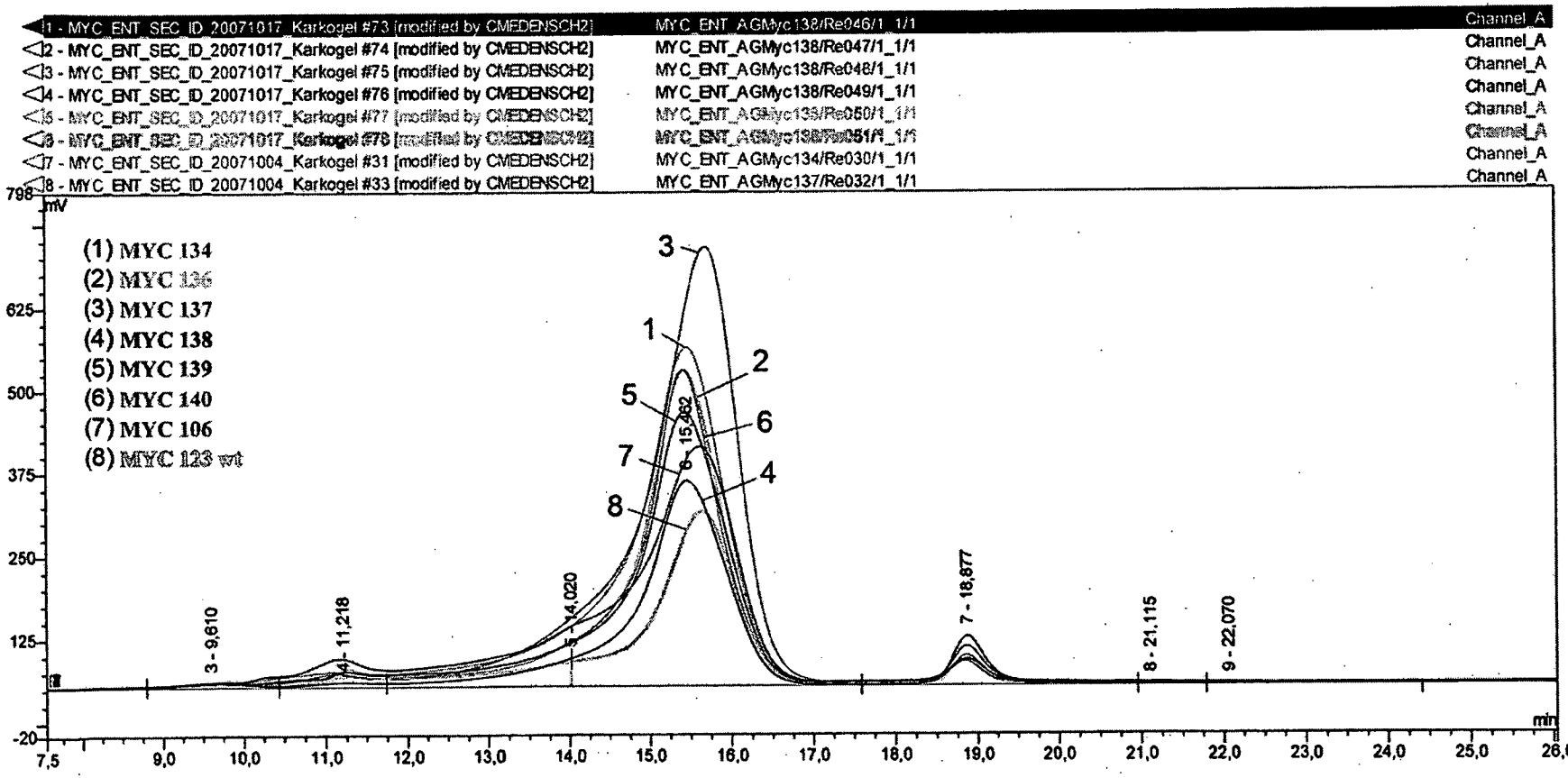

1 - MYC_ENT_SEC_ID_20071017_Karkogel #73 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc138/Re046/1_1/1 Channel_A
2 - MYC_ENT_SEC_ID_20071017_Karkogel #74 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc138/Re047/1_1/1 Channel_A
3 - MYC_ENT_SEC_ID_20071017_Karkogel #75 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc138/Re048/1_1/1 Channel_A
4 - MYC_ENT_SEC_ID_20071017_Karkogel #76 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc138/Re049/1_1/1 Channel_A
7 - MYC_ENT_SEC_ID_20071004_Karkogel #31 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc134/Re030/1_1/1 Channel_A
8 - MYC_ENT_SEC_ID_20071004_Karkogel #33 [modified by CMEDENSCH2] MYC_ENT_AGMyc137/Re032/1_1/1 Channel_A
798
mV
625
500
375
250
125
-20
(1) MYC 134
(2) MYC 136
(3) MYC 137
(4) MYC 138
(5) MYC 139
(6) MYC 140
(7) MYC 106
(8) MYC 123 wt
3
1
2
5
6
7
4
8
15,362
3 - 9,610
4 - 11,218
14,020
7 - 18,877
8 - 21,115
9 - 22,070
min
7,5
9,0
10,0
11,0
12,0
13,0
14,0
15,0
16,0
17,0
18,0
19,0
20,0
21,0
22,0
23,0
24,0
25,0
26,0

Fig. 19

437

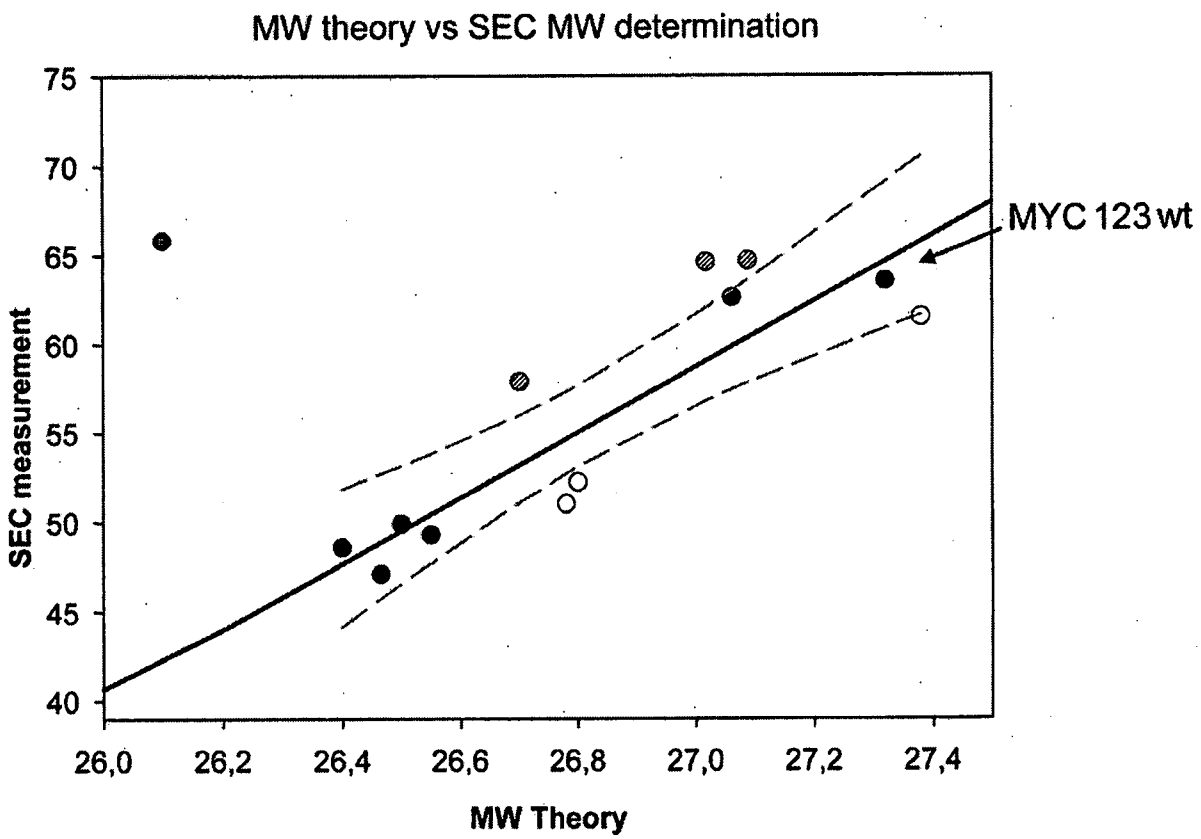

MW theory vs SEC MW determination
75
70
65
60
55
50
45
40
SEC measurement
26,0
26,2
26,4
26,6
26,8
27,0
27,2
27,4
MW Theory
MYC 123 wt

Fig. 20

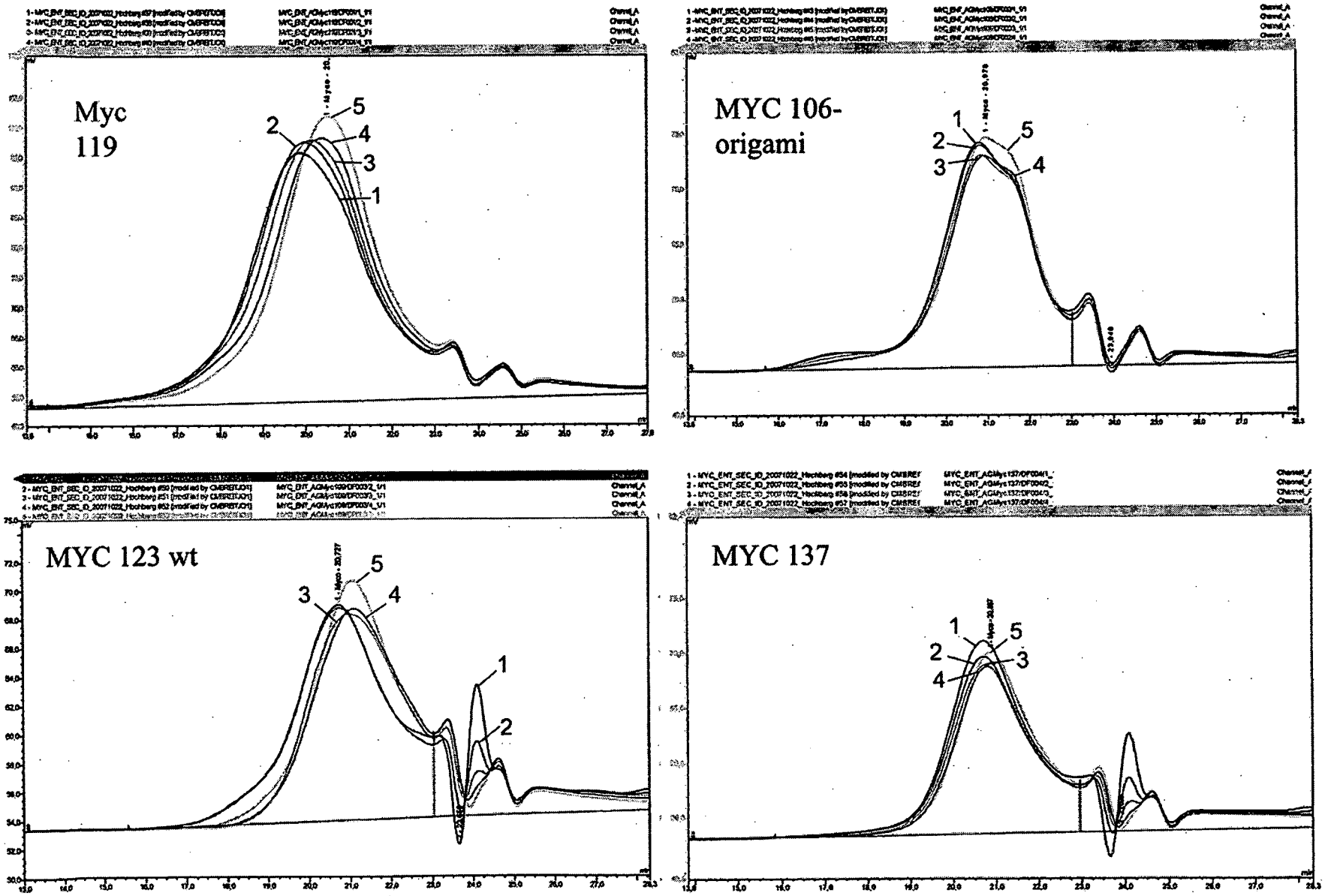


Fig. 21

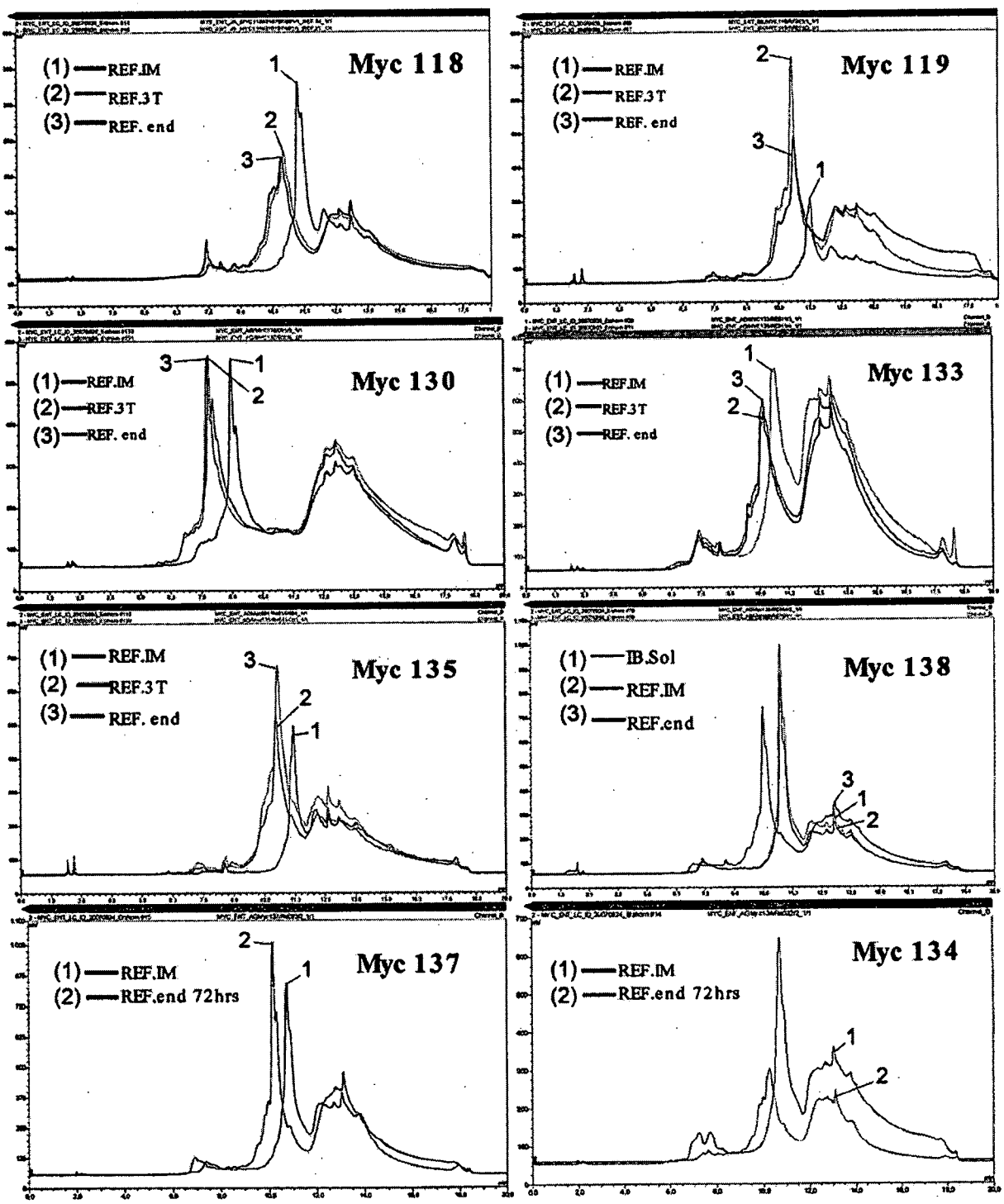

(1) REF.IM
(2) REF.3T
(3) REF. end
Myc 118
Myc 119
Myc 130
Myc 133
Myc 135
(1) IB.Sol
(2) REF.IM
(3) REF.end
Myc 138
(1) REF.IM
(2) REF.end 72hrs
Myc 137
Myc 134

Fig. 22

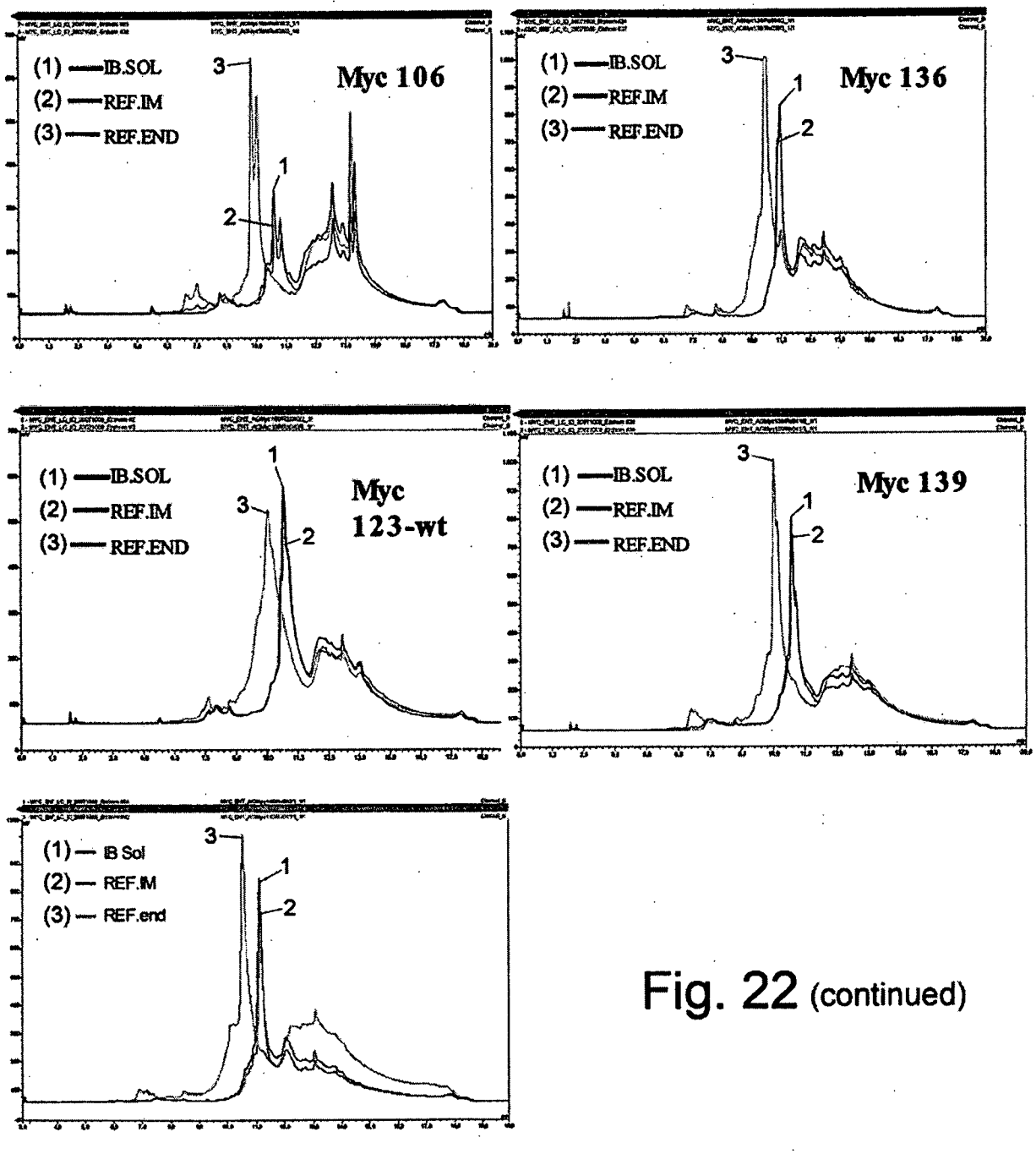


Fig. 22 (continued)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/055006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/14 A61K39/395 A61P31/00 A61K35/00 C12N15/10
C07K16/18
ADD. A61P37/06
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/76627 A (NEUTEC PHARMA PLC [GB]; BURNIE JAMES P [GB]) 18 October 2001 (2001-10-18) cited in the application page 11, paragraph ANTIBODY; claim 20; sequence 2 page 32, paragraphs CLINICAL,STUDY - page 40	1-30

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 September 2008	25/09/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Siaterli, Maria

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATTHEWS R C ET AL: "HUMAN RECOMBINANT ANTIBODY TO HSP90: A NATURAL PARTNER IN COMBINATION THERAPY" CURRENT MOLECULAR MEDICINE, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, vol. 5, no. 4, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 403-411, XP009085275 ISSN: 1566-5240	1-19, 24-30
Y	page 406, left-hand column, last line - page 409, left-hand column, paragraph CONCLUSIONS page 407, left-hand column, paragraph 2 page 407, right-hand column, paragraph 2 - page 408, paragraphs CLINICAL,STUDIES	20-23
X	MATTHEWS R C ET AL: "AUTOANTIBODY TO HEAT-SHOCK PROTEIN 90 CAN MEDIATE PROTECTION AGAINST SYSTEMIC CANDIDOSIS" IMMUNOLOGY, BLACKWELL PUBLISHING, OXFORD, GB, vol. 74, no. 1, 1 September 1991 (1991-09-01), pages 20-24, XP002067298 ISSN: 0019-2805 page 21, left-hand column, paragraph 2	1-19, 24-30
X	NECKERS L ET AL: "Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutics - An update" EXPERT OPINION ON EMERGING DRUGS 200502 GB, vol. 10, no. 1, February 2005 (2005-02), pages 137-149, XP008096224 ISSN: 1472-8214 paragraph [04.7]	1-12, 20-23
X	ANONYMOUS: "Mycograb" INTERNET ARTICLE, [Online] 16 June 2006 (2006-06-16), XP002495190 Retrieved from the Internet: URL:http://web.archive.org/web/20060616021547/http://neutecpharma.com/mycograb.html> [retrieved on 2008-09-09] the whole document	1-30

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/055006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EMEA: "Refusal CHMP assessment report for mycograb" EUROPEAN MEDICINES AGENCY, [Online] 20 March 2007 (2007-03-20), pages 1-46, XP002495191 London Retrieved from the Internet: URL:http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/mycograb/H-658-RAR-en.pdf> [retrieved on 2008-09-09] page 37, paragraph 2.6 - page 38, paragraph 4 page 42, paragraph 2 - page 43, paragraph 3	
X	WO 2006/003384 A (NEUTEC PHARMA PLC [GB]; BURNIE JAMES P [GB]; MATTHEWS RUTH CHRISTINE [ ) 12 January 2006 (2006-01-12) page 30, paragraph EXPERIMENTS - page 32, paragraph CONCLUSIONS	11,12, 20-23
X	MATTHEWS RUTH C ET AL: "Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY JUL 2003, vol. 47, no. 7, July 2003 (2003-07), pages 2208-2216, XP002495192 ISSN: 0066-4804	1-19, 24-30
Y	page 2209, left-hand column, paragraph 2 page 2209, right-hand column, paragraph 2 page 2210, right-hand column, paragraph 6	20-23
Y	WO 02/069900 A (CONFORMA THERAPEUTICS CORP [US]; FRITZ LAWRENCE C [US]; BURROWS FRANCI) 12 September 2002 (2002-09-12) claims 53,59-64	24-27
Y	WO 2005/000300 A (VERNALIS CAMBRIDGE LTD [GB]; CANCER REC TECH LTD [GB]; INST OF CANCER) 6 January 2005 (2005-01-06) abstract	24-27
X	MATTHEWS R ET AL: "Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis." CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS (LONDON, ENGLAND : 2000) APR 2001, vol. 2, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 472-476, XP008096251 ISSN: 1472-4472 page 474, left-hand column, paragraph 5 - page 475, right-hand column, paragraph 1	1-19, 28-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/055006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0176627 A	18-10-2001	AT 364396 T	15-07-2007
		AU 4089001 A	23-10-2001
		AU 2001240890 B2	16-06-2005
		BR 0109846 A	03-06-2003
		CA 2401836 A1	18-10-2001
		CN 1420786 A	28-05-2003
		CN 101095952 A	02-01-2008
		DE 60128893 T2	06-12-2007
		DK 1267925 T3	15-10-2007
		EP 1267925 A1	02-01-2003
		ES 2287105 T3	16-12-2007
		JP 2003530357 T	14-10-2003
		NO 20024815 A	02-12-2002
		NZ 520899 A	24-03-2005
		PL 358394 A1	09-08-2004
		US 2008193459 A1	14-08-2008
		US 2008181884 A1	31-07-2008
		US 2003180285 A1	25-09-2003
WO 2006003384 A	12-01-2006	AU 2005259002 A1	12-01-2006
		CA 2572318 A1	12-01-2006
		CN 101010100 A	01-08-2007
		EP 1763366 A1	21-03-2007
		KR 20070050918 A	16-05-2007
		US 2008038267 A1	14-02-2008
WO 02069900 A	12-09-2002	AU 2002252179 A1	19-09-2002
		CA 2440809 A1	12-09-2002
		EP 1423080 A2	02-06-2004
WO 2005000300 A	06-01-2005	EP 1638555 A1	29-03-2006
		US 2006235058 A1	19-10-2006

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCIÓN [✓] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- Descripción de la invención [✓]
- Dibujos de ser estos pertinentes [✓]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA [✓] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-119382- -00000-0000
Fecha: 2009-10-23 17:03:59 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 445

arrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia