

Molécula similar a un anticuerpo que comprende un heterodímero de la proteína humana CD1b (grupo de diferenciación 1)

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, específicamente a moléculas similares a anticuerpos que comprenden un heterodímero de dominios proximales de membrana de la proteína humana CD1b (grupo de diferenciación 1), así como a un proceso para producir dichas moléculas similares a anticuerpos. La invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica dicha molécula similar a anticuerpo, un vector de expresión, una célula huésped para producir dicha molécula similar a anticuerpo y a un método para producir dicha célula.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales en forma de moléculas quiméricas, humanizadas o totalmente humanas han demostrado su utilidad como medicamentos eficaces para tratar múltiples trastornos y enfermedades.

Las moléculas de anticuerpos humanos naturales están representadas por heterotetrámeros formados por dos cadenas ligeras y dos pesadas: las cadenas pesadas forman un homodímero y cada cadena pesada forma un heterodímero con una cadena ligera afín. Los anticuerpos monoclonales convencionales en forma de moléculas enteras consisten en heterotetrámeros bivalentes ("de dos brazos") de cadenas pesadas y ligeras.

Las enfermedades son a menudo el resultado de varias patologías y se acompañan de muchas enfermedades concomitantes. Los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos son capaces de unirse y, por tanto, neutralizar dos o más antígenos distintos por molécula de anticuerpo. El potencial de mejora significativa de las propiedades terapéuticas (y del valor) de los medicamentos en comparación con los anticuerpos monoclonales monoespecíficos ha convertido a los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos en un activo campo de investigación. En los últimos veinte años, la literatura ha descrito muchas soluciones relativas a las versiones de ingeniería de los anticuerpos biespecíficos, como se describe en Brinkmann, U and RE Kontermann, 2017, The Making of Bispecific Antibodies, MAbs; 209 Feb/Mar; 9(2):182–212, doi: 10.1080/19420862.2016.1268307.

Como se ha mencionado anteriormente, existen muchos enfoques para crear moléculas con dominios de unión a antígenos combinados, es decir, con dominios de unión a antígenos que difieren entre sí. Sin embargo, cada uno de estos métodos tiene sus desventajas.

La reticulación por métodos químicos es un proceso que requiere mucho tiempo, ya que las porciones correspondientes deben purificarse de homodímeros y otros subproductos indeseables. Además, los pasos de modificación química pueden alterar la integridad de las proteínas, perjudicando así la estabilidad de las mismas. Por tanto, el método anterior suele ser ineficaz y puede conducir a la pérdida de la actividad del anticuerpo.

Un método basado en la fusión celular (por ejemplo, la producción de hibridomas) es un ensamblaje arbitrario de dos cadenas pesadas y dos ligeras, lo que da como resultado 10 combinaciones de anticuerpos.

Los anticuerpos heteromultiméricos diana son sólo una pequeña parte de los anticuerpos producidos de este modo. El aislamiento de proteínas heteromultiméricas diana reduce significativamente el rendimiento del producto y aumenta los costes de producción.

Las técnicas de ADN recombinante se emplean para crear varios anticuerpos heteromultiméricos, por ejemplo, fragmentos de Fv de cadena única, diacuerpos, etc. que no tienen un fragmento Fc. La principal desventaja de este tipo de molécula de anticuerpo es la ausencia del dominio Fc, que hace que el anticuerpo no desencadene una función efectora (como, por ejemplo, la activación del complemento, la unión al receptor Fc, etc.). Por lo tanto, existe la necesidad de un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que comprenda un dominio Fc funcional.

También se emplean técnicas de ADN recombinante para diseñar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos acoplados mediante la tecnología Botón en Ojal (del inglés Knob-into-Holes) (véanse, por ejemplo, las publicaciones de las solicitudes internacionales WO9627011 y WO9850431). Un factor que limita el uso del método anterior es el hecho de que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos iniciales deben ser idénticas para evitar el emparejamiento erróneo y la formación de moléculas indeseables y/o inactivas cuando se expresan en una sola célula.

La pureza del producto de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos depende de los dos factores siguientes:

- a) ensamblaje heterodimérico de dos cadenas pesadas distintas coexpresadas en una célula, y
- b) emparejamiento correcto de dos cadenas ligeras distintas con cadenas pesadas afines.

La tecnología "Botón en Ojales" (del inglés Knob-into-Holes) para diseñar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos resuelve el problema del ensamblaje heterodimérico correcto de dos cadenas pesadas distintas coexpresadas en una célula. Sin embargo, el uso exclusivo de la tecnología "Botón en Ojal" para diseñar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos sólo permite obtener un rendimiento aproximado del 25% de productos biespecíficos o multiespecíficos correctamente ensamblados, ya que el problema del emparejamiento correcto de dos cadenas ligeras distintas con sus cadenas pesadas afines sigue sin resolverse.

El problema del emparejamiento correcto de dos cadenas ligeras distintas con sus cadenas pesadas afines se resuelve de varias maneras:

1. Uso de una cadena ligera idéntica en la primera y segunda porciones de unión a antígeno del anticuerpo (Van Blarcom T ET AL., Productive common light chain libraries yield diverse panels of high affinity bispecific antibodies, MAbs. 2018 Feb/Mar;10(2):256-268. doi: 10.1080/19420862.2017.1406570).

La desventaja de la solución anterior es la no universalidad de la misma, ya que puede ser problemático seleccionar una cadena ligera adecuada para ambas valencias. Además, en caso de sustituciones de aminoácidos en la cadena ligera para optimizar las propiedades del fragmento de unión al antígeno, las sustituciones afectarán a ambas valencias. Además, la unión del anticuerpo al segundo antígeno puede verse alterada.

2. Utilización de formatos de cadena única, es decir, formatos en los que las cadenas ligeras y pesadas del fragmento de unión al antígeno específico para el primer antígeno están conectadas entre sí mediante un enlazador de varios aminoácidos.

Este formato tiene desventajas tecnológicas, ya que utiliza conectores para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) con otra proteína de unión (por ejemplo, scFv o scFab), o para fusionar, por ejemplo, dominios variables ligeros y pesados (VH y VL) dentro de scFv o una cadena ligera (VL-CK(o CL)) con VH-CH1 dentro de scFab. Los conectores pueden causar problemas en entornos terapéuticos. De hecho, estos péptidos extraños pueden provocar una respuesta inmunitaria contra el propio conector o la región de unión entre la proteína y el conector. Además, la naturaleza flexible de estos péptidos y su movilidad los hacen más propensos a la escisión proteolítica, lo que puede dar lugar a una mala estabilidad del anticuerpo, a su agregación y a una mayor inmunogenicidad.

3. Modificación de los dominios CH1-CK en un anticuerpo biespecífico o multiespecífico para permitir la alteración de la interfaz de interacción en técnicas de expresión de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos a fin de excluir la asociación incorrecta de cadenas ligeras. Por ejemplo, la publicación de la solicitud internacional WO2017059551 proporciona varias sustituciones de aminoácidos en CH1 y/o CK que promueven el emparejamiento preferido entre la cadena pesada deseada y la cadena ligera deseada.

A pesar de las diversas tecnologías de expresión de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos mencionadas anteriormente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de mejorar la pureza del producto de anticuerpo biespecífico o multiespecífico, así como de una solución de producción escalable para producir anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos correctamente ensamblados.

Divulgación de la invención

Desarrollado por los autores de la presente invención, el novedoso formato de moléculas similares a anticuerpos que comprenden un heterodímero de dominios proximales de membrana de la proteína CD1b (grupo de diferenciación 1), así como el proceso para producir dichas moléculas similares a anticuerpos sorprendentemente permiten producir un alto rendimiento de producto con un correcto ensamblaje heterodimérico de dos cadenas pesadas distintas coexpresadas en una célula y con un correcto emparejamiento de dos cadenas ligeras distintas con cadenas pesadas afines.

Desarrollado por los autores de la presente invención, el novedoso formato de moléculas similares a anticuerpos que comprenden un heterodímero de dominios proximales de membrana de la proteína CD1b, así como el proceso para producir dichas moléculas similares a anticuerpos permiten sorprendentemente producir un producto correctamente ensamblado de moléculas similares a anticuerpos con alta pureza.

En consecuencia, los resultados anteriores reducen los costes de producción y conducen a una solución de producción escalable para producir moléculas similares a anticuerpos adecuadamente ensambladas.

Definiciones y métodos generales

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que suelen entender los expertos en la técnica.

Además, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los términos en plural, y los términos en plural incluirán los términos en singular. Normalmente, la presente clasificación y los métodos de cultivo celular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química de síntesis orgánica, química médica y farmacéutica, así como la hibridación y la química de las proteínas y los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son bien conocidos por los expertos y ampliamente utilizados en la técnica. Las reacciones enzimáticas y los métodos de purificación se llevan a cabo según las directrices del fabricante, como es habitual en la técnica, o como se describe en el presente documento.

El término "KD" en esta descripción se refiere a la constante de afinidad (o constante de equilibrio), que se calcula a partir de la relación entre K_d y K_a (es decir, K_d/K_a), y se expresa como una concentración molar (M).

La "afinidad de unión" suele referirse a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca (característica, verdadera) que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera de unión Y puede representarse normalmente mediante la constante de afinidad (KD). El valor K_d preferido es de aproximadamente 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, o menos. La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la presente descripción. Los anticuerpos de baja afinidad suelen unirse a un antígeno de forma lenta y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad suelen unirse a un antígeno de forma más rápida y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede utilizarse para los fines de la presente invención.

El término " K_d ", "koff" o "kdis" se refiere a la constante de velocidad de disociación de una determinada interacción entre una molécula de unión y un antígeno. La constante de velocidad de disociación koff puede medirse mediante interferometría de biocapa, por ejemplo, utilizando el sistema Octet™.

El término " K_a ", "kon" o "on-rate" se refiere a la constante de velocidad de asociación.

El término " R^2 " se refiere al coeficiente de determinación.

Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto dicte lo contrario, se entenderá que las palabras "incluir" y "comprender", o variaciones de las mismas como "incluye", "incluyendo", "comprende" o "comprendiendo", implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Molécula similar a un anticuerpo

La presente invención se refiere a una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a una primera y una segunda diana.

La molécula similar a un anticuerpo según la invención es una molécula similar a un anticuerpo monoclonal.

El término "molécula similar a un anticuerpo monoclonal" se refiere a una molécula similar a un anticuerpo que es sintetizada y secretada por una población clonal separada de células.

La molécula similar a un anticuerpo según la invención es una molécula similar a un anticuerpo monoclonal recombinante.

El término "molécula recombinante similar a anticuerpo" se refiere a una molécula similar a anticuerpo que se expresa en una célula o línea celular que comprende secuencia(s) nucleotídica(s) que codifica(n) la molécula similar a anticuerpo, en la que dicha(s) secuencia(s) nucleotídica(s) no está(n) asociada(s) a la célula en la naturaleza.

La molécula similar a un anticuerpo según la invención es una molécula similar a un anticuerpo monoclonal recombinante aislada.

El término "aislado" utilizado para describir diversas moléculas similares a anticuerpos según la presente descripción se refiere a una molécula similar a un anticuerpo que ha sido identificada y aislada y/o regenerada a partir de una célula o cultivo celular en el que se expresa. Las impurezas (componentes contaminantes) del entorno natural son materiales que suelen interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. El polipéptido aislado suele prepararse mediante al menos una etapa de purificación.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a primera y segunda dianas, en la que dicha molécula similar a un anticuerpo comprende:

(i) a) un dominio constante de cadena ligera que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana;

y

b) un primer dominio constante de cadena pesada que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana;

o

(ii) a) un dominio constante de cadena ligera que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana;

y

b) un primer dominio constante de cadena pesada que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana;

en el que la microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana y el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana forman entre sí un heterodímero estabilizado por un enlace disulfuro.

El dominio $\alpha 3$ de la proteína CD1b humana (dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana) y la microglobulina $\beta 2$ de la proteína CD1b humana son dominios proximales a la membrana de la proteína CD1b humana.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a primera y segunda dianas, en la que dicha molécula similar a un anticuerpo comprende:

(i) a) un dominio constante de cadena ligera que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

y

b) un primer dominio constante de cadena pesada que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

o

(ii) a) un dominio constante de cadena ligera que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) un primer dominio constante de cadena pesada que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

en el que la microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana y el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana forman entre sí un heterodímero estabilizado por un enlace disulfuro.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a primera y segunda dianas, en la que dicha molécula similar a un anticuerpo comprende:

1) un primer fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a la primera diana y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión a antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende segundos (CH2) y terceros (CH3) dominios constantes de cadena pesada;

y

2) un segundo fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a la segunda diana y comprende:

(i) a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana (grupo de diferenciación 1) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

o

(il) a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende segundos (CH2) y terceros (CH3) dominios constantes de cadena pesada;

en el que la microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 forman entre sí un heterodímero que está estabilizado por un enlace disulfuro.

En la anterior molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a la primera y segunda dianas, los dominios variable y constante se localizan en las cadenas pesada y ligera en la siguiente secuencia:

la cadena ligera del primer fragmento de unión a antígeno:

- 1) un dominio variable de la cadena ligera,
- 2) un dominio constante de la cadena ligera;

la cadena pesada del primer fragmento de unión a antígeno:

- 1) un dominio variable de la cadena pesada,
- 2) un primer dominio constante de la cadena pesada (CH1),
- 3) un segundo dominio constante de la cadena pesada (CH2), y
- 4) un tercer dominio constante de la cadena pesada (CH3);

la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno:

- 1) un dominio variable de la cadena ligera,
- 2) un primer dominio proximal a la membrana de la proteína CD1b humana;

la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno:

- 1) un dominio variable de la cadena pesada,
- 2) un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína CD1b humana
- 3) un segundo dominio constante de la cadena pesada (CH2), y
- 4) un tercer dominio constante de la cadena pesada (CH3).

La molécula tipo anticuerpo de la invención se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. La primera cadena ligera consta de una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL1) y una región constante de cadena ligera. Preferiblemente, la primera cadena ligera es una cadena ligera kappa (κ), y el dominio constante CL es preferiblemente C kappa (κ). La primera cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH1) y una región

constante de la cadena pesada que comprende CH1-CH2-CH3. La segunda cadena ligera consta de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL2) y una región constante de cadena ligera que está representada por el primer dominio proximal a la membrana de la proteína CD1b humana. La segunda cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH2) y una región constante de la cadena pesada que comprende el segundo dominio proximal a la membrana de la proteína CD1b humana y CH2-CH3.

La molécula similar a anticuerpo según la invención puede ser una molécula similar a anticuerpo de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, preferentemente IgG) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, preferentemente IgG1).

Las regiones VL y VH pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas entre regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amínico al extremo carboxilo en el siguiente orden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

Las regiones constantes de la molécula similar al anticuerpo pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "fragmento de unión a antígeno", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de molécula similar a un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno.

"Esquema de numeración de Kabat" o "numeración según Kabat", tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere al sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de moléculas similares a anticuerpos (Kabat et al. Ann. N.Y. Acad. Sci., 190:382-93 (1971); Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

La molécula similar a un anticuerpo de la presente invención "que se une específicamente" a un antígeno diana o diana se refiere a una molécula similar a un anticuerpo que se une a un antígeno o diana con suficiente afinidad como para que la molécula similar a un anticuerpo pueda utilizarse como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a una proteína o célula o tejido que exprese el antígeno, y reaccione ligeramente de forma cruzada con otras proteínas.

El término "se une específicamente a" un polipéptido concreto o a un epítipo de un polipéptido diana concreto puede describirse mediante el ejemplo de una molécula que tenga una Kd para la diana de al menos unos 200 nM, o al menos unos 150 nM, o al menos unos 100 nM, o al menos unos 60 nM o al menos aproximadamente 50 nM, o al menos aproximadamente 40 nM, o al menos aproximadamente 30 nM, o al menos aproximadamente 20 nM, o al menos aproximadamente 10 nM, o al menos

aproximadamente 8 nM, o al menos aproximadamente 6 nM, o al menos aproximadamente 4 nM, o al menos aproximadamente 2 nM, o al menos aproximadamente 1 nM, o inferior.

En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un determinado polipéptido o epítipo en un determinado polipéptido sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo en un polipéptido.

La región cristalizable del fragmento ("región Fc, Fc") de una inmunoglobulina es la región terminal de una molécula de inmunoglobulina que interactúa con el receptor Fc de la superficie celular, así como con algunas proteínas del sistema del complemento. Esta propiedad permite a los anticuerpos o a la molécula similar al anticuerpo, según la invención, activar el sistema inmunitario. En los isotipos IgG, IgA e IgD, la región Fc está compuesta por dos fragmentos proteicos idénticos del segundo y tercer dominios constantes de las dos cadenas pesadas, respectivamente; en los isotipos IgM e IgE, el Fc contiene tres dominios constantes de la cadena pesada (dominios CH2, CH3 y CH4) en cada cadena polipeptídica.

Por "monómero de fragmento Fc" se entiende una región Fc de los dominios constantes segundo y tercero de una de las dos cadenas pesadas (para los isotipos IgG, IgA e IgD); para los isotipos IgM e IgE, el monómero Fc contiene tres dominios constantes de una de las dos cadenas pesadas (dominios CH2, CH3 y CH4).

CD1 (grupo de diferenciación 1) se refiere a una molécula del grupo de diferenciación 1 que es un componente del sistema inmunitario localizado en la superficie de varias células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, los macrófagos y otras células. Al igual que las clases I y II del CMH, la CD1 presenta antígenos para su reconocimiento por parte de las células T mediante la interacción con el receptor de células T. A diferencia de las clases I y II del CMH, las proteínas CD1 presentan lípidos y sus derivados en lugar de péptidos.

La pluralidad de variantes de CD1 encontradas en humanos se divide en 5 grupos: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, que difieren en la estructura del fragmento de unión al antígeno y, en consecuencia, en la especificidad para lípidos de diferentes estructuras. Las proteínas CD1e, a diferencia de las proteínas de otros grupos, no se expresan en la superficie celular, sino que son solubles y son responsables del transporte de lípidos (Kaczmarek, R., Pasciak, M., Szymczak-Kulus, K., & Czerwinski, M. (2017). CD1: A Singed Cat of the Three Antigen Presentation Systems. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), 201–214).

Las moléculas CD1 son estructuralmente similares al CMH de clase I. De forma parecida, una molécula CD1 es un complejo no covalente formado por dos cadenas polipeptídicas: una cadena α polimórfica (a veces denominada cadena pesada) y una cadena más pequeña denominada microglobulina $\beta 2$ (también conocida como cadena ligera) que generalmente no es polimórfica.

La cadena α forma una región de unión al antígeno que comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Al dominio $\alpha 2$ le sigue el dominio $\alpha 3$ situado en el extremo C de la porción extracelular de la cadena α de la CD1 y forma junto con la microglobulina $\beta 2$ un complejo heterodimérico no covalente. Dicho complejo heterodimérico no covalente compuesto por el dominio $\alpha 3$ de CD1 y la microglobulina $\beta 2$ se denomina en

la descripción de la presente invención heterodímero de dominios proximales a la membrana de la proteína CD1b.

Por dominios proximales a la membrana de la proteína CD1b humana se entiende el dominio $\alpha 3$ de la proteína CD1b humana y la microglobulina $\beta 2$ de la proteína CD1b humana.

$\beta 2M$ de la proteína CD1b humana en la molécula similar al anticuerpo según la invención es $\beta 2M$ de la proteína CD1b humana de tipo salvaje con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

El dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana en la molécula similar al anticuerpo según la invención es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que difiere del dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana de tipo salvaje con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en que tiene mutaciones S12K y N59D y elongación GSC en el extremo C.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un dominio CH3 de una cadena pesada y un dominio CH3 de otra cadena pesada que contactan entre sí a través de superficies que se modifican para formar la molécula similar al anticuerpo, en la que las modificaciones en los dominios CH3 de cadenas pesadas son sustituciones para proporcionar heterodimerización.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende:

a) Dominio CH3 de una cadena pesada, que se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada que entra en contacto con la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada en la molécula similar a un anticuerpo, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, lo que conduce a la formación de un botón en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada que puede encajar en un ojal en la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada,

y

b) el dominio CH3 de otra cadena pesada que se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada que entra en contacto con la superficie del dominio CH3 de la primera cadena pesada en la molécula similar a un anticuerpo, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor, lo que conduce a la formación de un ojal en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada capaz de encajar un botón en la interfaz del dominio CH3 de la primera cadena pesada;

en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona de un grupo que incluye arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W),

y en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de un grupo que incluye alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un dominio constante de la primera cadena ligera del anticuerpo, que se selecciona de CK o CL.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende dominios CH3 del anticuerpo que se modifican mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las

posiciones correspondientes de cada dominio CH3 de modo que pueda formarse un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un dominio CH3 de una cadena pesada, que se modifica para formar el botón, y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que se modifica para formar el ojal, o viceversa.

"Botón en Ojal" (interacciones del tipo "Botón en Ojal" del inglés "knobs-into-holes") es un enfoque que permite sortear el problema asociado a los subproductos mal reparados. Este enfoque pretende forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes de anticuerpo o molécula similar al anticuerpo mediante la introducción de mutaciones en los dominios CH3 para modificar las interfaces de contacto. En una cadena, los aminoácidos voluminosos fueron sustituidos por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "ojal" ("hole"). A la inversa, se introdujeron aminoácidos con cadenas laterales más grandes en el otro dominio CH3 para crear un "botón" ("knob"). Mediante la coexpresión de estas dos cadenas pesadas, se produjo un alto rendimiento de formación de heterodímeros ("botón-ojal") frente a la formación de homodímeros ("botón-botón" o "ojal-ojal") (véanse, por ejemplo, las publicaciones de las solicitudes internacionales WO9627011 y WO9850431).

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un dominio CH3 de una cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos, y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407V según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un dominio CH3 de una cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407 según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos, y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un fragmento Fc que pertenece a IgG.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un fragmento Fc seleccionado del grupo que comprende: IgG1, IgG2 o IgG4 humanas.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un monómero de fragmento Fc que comprende sustituciones que no conducen a propiedades ADCC, CDC y/o ADCP en la molécula similar al anticuerpo.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un monómero de fragmento Fc que comprende sustituciones L234A y L235A según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un monómero de fragmento Fc que comprende sustituciones que conducen a una acción prolongada de la molécula similar al anticuerpo.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un monómero de fragmento Fc que comprende sustituciones M252Y, S254T y T256E según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un monómero de fragmento Fc que comprende sustituciones que conducen a propiedades ADCC, CDC y/o ADCP mejoradas en la molécula similar al anticuerpo.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo comprende un monómero de fragmento Fc que comprende la sustitución E345R según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

Las mutaciones anteriores en el fragmento Fc están numeradas según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de cadenas de anticuerpos (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969), pp. 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

El término "función efectora" del anticuerpo o de la molécula similar al anticuerpo se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (secuencia nativa de la región Fc o a variantes de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo o de una molécula similar al anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo o de la molécula similar al anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo o de la molécula similar al anticuerpo se incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación a la baja de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B, BCR), y activación de células B.

La "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una respuesta mediada por células, en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido o una molécula similar a un anticuerpo en una célula diana y posteriormente causan la lisis o fagocitosis de la célula diana.

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o varios FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función de efector de ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC se encuentran las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos; siendo preferibles las PBMC y las células NK.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia con la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula complejada con un antígeno afín.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo se une específicamente a la primera y segunda dianas, en las que la diana se refiere a un único antígeno.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo se une específicamente a la primera y segunda dianas, entendiéndose por diana dos, tres o más antígenos estructuralmente similares.

Un experto en la materia apreciará que los anticuerpos y las moléculas similares a anticuerpos pueden tener reactividad cruzada debido a la similitud de las estructuras proteicas de los antígenos/destino. Por ejemplo, los anticuerpos contra la proteína 1 de la muerte celular programada (PD-1) pueden tener reactividad cruzada con otros miembros de la familia de receptores CD28, incluidos también CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. A su vez, los anticuerpos contra GITR (Proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides) pueden tener reactividad cruzada con otros representantes de la superfamilia TNFRSF, incluidos también CD137, OX40 y CD27. Normalmente se evita la reactividad cruzada de los anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, la publicación de la solicitud PCT WO 2006/121168 proporciona un anticuerpo que se une a PD-1 pero no se une sustancialmente a CD28, CTLA-4 e ICOS humano. Sin embargo, la reactividad cruzada es una característica importante para una serie de anticuerpos terapéuticos; por ejemplo, la técnica anterior proporciona el anticuerpo monoclonal ustekinumab que se une a la subunidad p40 común tanto a la IL12 como a la IL23 (Juliane Weber ET AL., Ustekinumab, BioDrugs, 2009, 23(1):53-61. doi: 10.2165/00063030-200923010-00006). También se conocen los anticuerpos que comprenden dos fragmentos de unión al antígeno, en los que uno de los fragmentos de unión al antígeno se une a 2 antígenos IL17A o IL17F, ya que estas interleucinas tienen un alto porcentaje de identidad estructural; así, estos anticuerpos con dos fragmentos de unión al antígeno son específicos para 3 antígenos a la vez. Por ejemplo, la patente US10562967 proporciona un anticuerpo que comprende dos fragmentos de unión al antígeno y es específico para 3 antígenos, IL-23p19, IL-17A e IL-17F, mientras que la publicación de la solicitud PCT WO2017188850 proporciona un anticuerpo que comprende dos fragmentos de unión al antígeno y es específico para 3 antígenos, TNF alfa, IL-17A e IL-17F. Basándose en lo anterior, la diana a la que se une la molécula similar al anticuerpo según la invención se entiende como un antígeno (de una proteína u otra naturaleza) que comprende un epítipo que es reconocido y unido por el sitio de unión al antígeno de la molécula similar al anticuerpo, o a antígenos (de una proteína u otra naturaleza) que comprenden epítopos que son reconocidos y unidos por el sitio de unión al antígeno de la molécula similar al anticuerpo. En caso de que la molécula similar a un anticuerpo comprenda múltiples sitios de unión a antígenos que reconozcan y se unan a dianas distintas (incluidos los casos en los que un único sitio de unión a antígenos sea capaz de reconocer y unirse a múltiples antígenos), dicho anticuerpo o molécula similar a un anticuerpo se considerará multiespecífica (bienespecífica en el caso de 2 antígenos, trisespecífica en el caso de 3 antígenos, tetraespecífica en el caso de 4 antígenos, etc.).

Las moléculas similares a anticuerpos según la invención, que comprenden dos fragmentos de unión a antígeno y se unen específicamente a al menos tres antígenos, por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, etc. antígenos, están dentro del alcance de la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar a anticuerpo se une específicamente a la primera y segunda dianas, en las que la primera y segunda dianas pueden seleccionarse cada una independientemente de un grupo que comprende: CD20, BCMA, PD-1, PD-L1, CD47, GD2, AXL, TGF beta, CSF1R, factor de coagulación sanguínea 9 (FIX), factor de coagulación sanguínea 10 (FX), TNF alfa, IL17A, IL17F o CD3.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo es una molécula similar al anticuerpo multiespecífica.

En algunas realizaciones de la invención, la molécula similar al anticuerpo es una molécula similar al anticuerpo biespecífica, trispecífica, tetraespecífica, pentaspecífica, hexaspecífica, heptaspecífica, octaespecífica o no específica.

En algunas realizaciones, la molécula similar al anticuerpo es una molécula similar al anticuerpo bivalente biespecífica.

Los materiales de la solicitud proporcionan las siguientes moléculas similares a anticuerpos: 08-001, 08-002, 08-003, 08-004, 08-005 o 08-006.

08-001 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a PD1 y CD20 y comprende:

1) un primer fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PD1 y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 5 y un dominio constante de cadena ligera;

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 4 y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD20 y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 7 y un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 6, un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

08-001 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a PD1 y CD20 y comprende:

1) un primer fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PD1 y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión a antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (Prolgolimab_VL_CK);

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (Prolgolimab_VH_HC_hole);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD20 y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (Ocrelizumab_VL_CD1b);

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob).

08-002 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a CD20 y PD1 y comprende:

1) un primer fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD20 y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 7 y un dominio constante de cadena ligera;

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 6 y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PD1 y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 5 y un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 4, un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

08-002 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a CD20 y PD1 y comprende:

1) un primer fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD20 y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión a antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (Ocrelizumab_VL_CK);

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (Ocrelizumab_VH_HC_hole);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PD1 y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (Prolgolimab_VL_CD1b);

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob).

08-003 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a PD1 y CSF1R y comprende:

1) un primer fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PD1 y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 5 y un dominio constante de cadena ligera;

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 4 y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CSF1R y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo contra CSF1R (Anti-CSF1R_VL) con SEQ ID NO: 9 y un dominio constante que es el dominio α 3 proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo contra CSF1R (Anti-CSF1R_VH) con SEQ ID NO: 8, un dominio constante que es β 2 microglobulina (β 2M) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

08-003 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a PD1 y CSF1R y comprende:

1) un primer fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PD1 y comprende:
a) la cadena ligera del primer fragmento de unión a antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (Prolgolimab_VL_CK);

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (Prolgolimab_VH_HC_hole);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CSF1R y comprende:
a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (Anti-CSF1R_VL_CD1b);

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 (Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob).

08-004 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a CSF1R y PD1 y comprende:

1) un primer fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CSF1R y comprende:
a) la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo contra CSF1R (Anti-CSF1R_VL) con SEQ ID NO: 9 y un dominio constante de cadena ligera;

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo contra CSF1R (Anti-CSF1R_VH) con SEQ ID NO: 8 y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PD1 y comprende:
a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 5 y un dominio constante que es el dominio α 3 proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 4, un dominio constante que es β 2 microglobulina (β 2M) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

08-004 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a CSF1R y PD1 y comprende:

1) un primer fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CSF1R y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (Anti-CSF1R_VL_CK);

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (Anti-CSF1R_VH_HC_hole);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PD1 y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 (Prolgolimab_VL_CD1b);

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob).

08-005 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a CD20 y CSF1R y comprende:

1) un primer fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD20 y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 7 y un dominio constante de cadena ligera;

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 6 y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CSF1R y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo contra CSF1R (Anti-CSF1R_VL) con SEQ ID NO: 9 y un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo contra CSF1R (Anti-CSF1R_VH) con SEQ ID NO: 8, un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

08-005 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a CD20 y CSF1R y comprende:

1) un primer fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD20 y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión a antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (Ocrelizumab_VL_CK);

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (Ocrelizumab_VH_HC_hole);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CSF1R y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (Anti-CSF1R_VL_CD1b);

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 (Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob).

08-006 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a CSF1R y CD20 y comprende:

1) un primer fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CSF1R y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo contra CSF1R (Anti-CSF1R_VL) con SEQ ID NO: 9 y un dominio constante de cadena ligera;

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo contra CSF1R (Anti-CSF1R_VH) con SEQ ID NO: 8 y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

y

2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD20 y comprende:

a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 7 y un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 6,

un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

08-006 es una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a CSF1R y CD20 y comprende:

- 1) un primer fragmento de unión al antígeno que se une específicamente al CSF1R y comprende:
 - a) la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (Anti-CSF1R_VL_CK);
 - y
 - b) la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (Anti-CSF1R_VH_HC_hole);
 - y
- 2) un segundo fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CD20 y comprende:
 - a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (Ocrelizumab_VL_CD1b);
 - y
 - b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob).

Estas moléculas similares a anticuerpos se dan a título ilustrativo para confirmar la operatividad del formato de la molécula similar al anticuerpo según la invención, así como propiedades sorprendentes de la misma. Tales moléculas similares a anticuerpos no deben interpretarse como limitantes de la molécula similar al anticuerpo de la invención.

Los parámetros de rendimiento del producto con el correcto ensamblaje heterodimérico de dos cadenas pesadas distintas y el correcto emparejamiento entre dos cadenas ligeras distintas y cadenas pesadas afines no dependen de los fragmentos variables de cadena pesada y ligera de la molécula similar al anticuerpo ni de su especificidad para los antígenos.

Las moléculas similares a anticuerpos según la invención pueden utilizarse para tratar diversas enfermedades, en particular, enfermedades oncológicas, enfermedades autoinmunes o enfermedades asociadas con trastornos de la coagulación de la sangre.

Molécula de ácido nucleico

En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica la molécula similar a un anticuerpo mencionada anteriormente.

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos", utilizados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que determina un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es un ADN o ARN de doble cadena, un ADN o ARN monocatenario, o productos de la transcripción de dichos ADN.

A menos que se indique lo contrario, el término secuencia de nucleótidos abarca su complemento. Por lo tanto, un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria del mismo con la secuencia complementaria del mismo.

En cualquiera de dichas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden aislarse.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella que se identifica y separa de al menos una molécula-impureza de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o conjunto en que se encuentra en condiciones naturales. Así, una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de una molécula de ácido nucleico que existe en las células en condiciones naturales.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 22-33. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender cualquier combinación de dichas secuencias de nucleótidos.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico aislado es ADN.

En una realización, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o pesada de la molécula similar al anticuerpo anterior según la invención, seleccionada entre:

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno, que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana (grupo de diferenciación 1) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

o

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

La molécula de ácido nucleico también puede comprender una combinación de las secuencias de nucleótidos anteriores necesarias para producir la molécula similar a un anticuerpo según la invención.

Como apreciarán los expertos en la materia, debido a la redundancia del código genético, una variedad de secuencias de ADN diferentes puede codificar las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera o la cadena pesada de la molécula similar a un anticuerpo según la invención o fragmentos de la misma (VH, VL, CDR, etc.). La creación de estas secuencias de ADN alternativas que codifican una y la misma secuencia de aminoácidos está dentro de la habilidad de aquellos entrenados en el arte. Tales secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la presente invención.

La molécula de ácido nucleico según la presente invención puede aislarse de cualquier fuente que produzca la molécula similar al anticuerpo según la invención. En ciertas realizaciones de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención puede sintetizarse mediante síntesis química, en lugar de aislarse.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-001 y 08-003 (Prolgolimab_VH_HC_hole) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-001 y 08-003 (Prolgolimab_VL_CK) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 23.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-001 y 08-006 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 24.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-001 y 08-006 (Ocrelizumab_VL_CD1b) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 25.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-002 y 08-005 (Ocrelizumab_VH_HC_hole) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 26.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-002 y 08-005 (Ocrelizumab_VL_CK) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 27.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-002 y 08-004 (Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 28.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-002 y 08-004 (Prolgolimab_VL_CD1b) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 29.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno de las moléculas tipo anticuerpo 08-003 y 08-005 (Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 30.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-003 y 08-005 (Anti-CSF1R_VL_CD1b) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 31.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-004 y 08-006 (Anti-CSF1R_VH_HC_hole) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 32.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno de las moléculas similares a anticuerpos 08-004 y 08-006 (Anti-CSF1R_VL_CK) y comprende una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 33.

Las moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para expresar la molécula similar al anticuerpo según la invención.

Vector

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico anteriores que codifican las correspondientes secuencias de aminoácidos de la molécula similar al anticuerpo según la invención. La presente invención se refiere a un vector adecuado para la expresión de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento.

El término "vector", tal y como se utiliza aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término "expresión" se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos concreta impulsada por su promotor.

La presente invención se refiere a vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las moléculas similares a anticuerpos anteriores o porciones estructurales de las mismas seleccionadas entre:

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del primer fragmento de unión al antígeno, que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del primer fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana (grupo de diferenciación 1) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del segundo fragmento de unión al antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

o

- un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un plásmido, es decir, un fragmento circular de ADN de doble cadena en el que pueden insertarse segmentos adicionales de ADN.

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un vector viral (de expresión), en el que pueden insertarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral.

En algunas realizaciones de la invención, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un sitio bacteriano de

origen de replicación y vectores episomales). En otras realizaciones de la invención, los vectores (por ejemplo, los vectores no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en una célula huésped, y por tanto se replican junto con el gen huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan aquí "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

En algunas realizaciones de la invención, los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas, como el virus del mosaico de la coliflor, el virus del mosaico del tabaco, cósmidos, cromosoma artificial de levadura y similares. Las moléculas de ADN pueden insertarse en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traslacional dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y traducción del ADN. Pueden elegirse un vector de expresión y secuencias de control de expresión que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada.

En una realización de la invención, las moléculas de ADN que codifican parcial o totalmente secuencias de cadenas pesadas y ligeras pueden insertarse en vectores distintos.

En una realización, cualquier combinación de las moléculas de ADN anteriores se introduce en el mismo vector de expresión.

En una realización de la invención, las moléculas de ADN pueden introducirse en un vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en un fragmento de gen de anticuerpo o molécula similar al anticuerpo y vector, o ligadura de extremo romo si no hay sitios de restricción presentes).

En algunas realizaciones de la invención, un vector adecuado es uno que incluye sitios de restricción tales que cualquier secuencia VH o VL puede insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. Un vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de moléculas similares a anticuerpos a partir de una célula huésped. El gen de una cadena de molécula similar a un anticuerpo puede clonarse en un vector de forma que el péptido señal esté unido en el marco al aminoterminal de una cadena de inmunoglobulina. Un péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

En algunas realizaciones de la invención, el vector puede incluir una secuencia de control de expresión. El término "secuencia de control de expresión", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para llevar a cabo la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se insertan. Los expertos en la materia entenderán que el diseño de un vector de expresión, incluida la selección de secuencias de control de la expresión, puede depender de factores tales como la elección del tipo de célula huésped que se va a transformar, el nivel requerido de expresión del anticuerpo o de la molécula similar al anticuerpo, etcétera. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales eficientes de procesamiento del ARN, como señales de empalme

y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y, cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción de la proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control de la expresión difiere en función del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control de la expresión suelen incluir un promotor, un sitio de unión al ribosoma, así como secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotas, dichas secuencias de control de la expresión suelen incluir promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control de expresión preferidas para una célula huésped de expresión en un mamífero incluyen elementos virales que aseguran altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, como promotores y/o potenciadores derivados de un LTR retroviral, citomegalovirus (CMV) (como un promotor/potenciador de CMV), virus simiano 40 (SV40) (como un promotor/ potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor principal tardío del adenovirus (AdMLP)), poliomavirus y promotores fuertes de mamíferos como el promotor TTR, el promotor nativo de inmunoglobulina o el promotor de actina. Las secuencias de control de expresión abarcan al menos todos los componentes cuya presencia es importante para la expresión y el procesamiento.

En algunas realizaciones de la invención, además de los genes de cadena de moléculas similares a anticuerpos y las secuencias de control de la expresión, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación de un vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador de selección facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido un vector.

Célula huésped

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una célula huésped para producir cualquiera de las moléculas similares a anticuerpos anteriores según la invención, y comprende transformar la célula con el vector o vectores anteriores que comprenden una combinación de las secuencias de nucleótidos anteriores necesarias para producir la molécula similar al anticuerpo anterior según la invención.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped para producir cualquiera de las moléculas similares a anticuerpos anteriores según la invención que comprende una combinación de las secuencias de nucleótidos anteriores necesarias para producir la molécula similar al anticuerpo anterior según la invención.

El término "célula huésped" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La presente invención se refiere a células huésped, que pueden incluir, por ejemplo, el vector descrito anteriormente según la invención. La presente invención se refiere además a células huésped que comprenden, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera, o ambas. Debe entenderse que "célula huésped" se refiere no sólo a una célula en particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias

ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a una célula parental; sin embargo, dichas células siguen estando incluidas en el alcance del término "célula huésped" tal y como se utiliza aquí.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican la anterior molécula similar al anticuerpo según la invención y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para la transfección de una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula bacteriana o una célula de levadura. La transfección puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son bien conocidos en la técnica e incluyen la transfección mediada por dextrano, la transfección de complejos polímero-ácido nucleico catiónico, la precipitación de fosfato cálcico, la transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplastos, la encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y la microinyección directa de ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamífero mediante vectores virales (de expresión).

Las líneas celulares de mamíferos utilizadas como huéspedes para la transformación son bien conocidas en la técnica e incluyen una pluralidad de líneas celulares inmortalizadas disponibles. Entre ellas se encuentran, por ejemplo, las células de ovario de hámster chino (CHO), las células NS0, las células SP2, las células HEK-293T, las células FreeStyle 293 (Invitrogen), las células NIH-3T3, las células HeLa, las células de riñón de hámster bebé (BHK), las células de riñón de mono verde africano (COS), las células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), las células A549, SK-HEP1, HUH7, las células Hep-RG y otras líneas celulares. Las líneas celulares se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y proporcionan las características necesarias de la proteína que se está produciendo. Otras líneas celulares que pueden utilizarse son las de insectos, como las células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican la molécula similar al anticuerpo de la invención se introducen en células huésped de mamífero, la molécula similar al anticuerpo se produce cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para expresar la molécula similar al anticuerpo de la invención en las células huésped, o, más preferiblemente, secretar la molécula similar al anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. La molécula similar al anticuerpo de la invención puede aislarse del medio de cultivo mediante técnicas estándar de purificación de proteínas. Las células huésped vegetales incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células huésped bacterianas incluyen las especies *Escherichia* y *Streptomyces*. Las células huésped de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Además, el nivel de producción de la molécula similar al anticuerpo de la invención mencionada anteriormente a partir de una línea celular productora puede mejorarse utilizando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para mejorar la expresión en ciertas condiciones.

Es probable que la citada molécula similar al anticuerpo de la invención en diferentes líneas celulares tenga patrones de glicosilación diferentes entre sí. Sin embargo, la anterior molécula similar al anticuerpo de la invención codificada por moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, o que comprenden secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento forman parte de la

presente invención, independientemente de la glicosilación de las moléculas de unión, y, en general, independientemente de la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales.

La célula huésped anterior no se refiere a una célula huésped producida utilizando embriones humanos.

La célula huésped anterior no se refiere a una célula huésped producida mediante la modificación de la integridad genética de las células de la línea germinal humana.

Método de producción de moléculas similares a anticuerpos

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir cualquiera de las moléculas similares a anticuerpos anteriores, en el que el método incluye las etapas de:

- a) transformar una célula huésped
 - con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas del primer fragmento de unión al antígeno de la molécula similar al anticuerpo,
 - con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas del segundo fragmento de unión al antígeno de la molécula similar al anticuerpo,
- b) cultivo de la célula huésped en condiciones adecuadas para la síntesis de dicha molécula similar al anticuerpo; y
- c) aislar dicha molécula similar a un anticuerpo a partir de un cultivo celular.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un electroforegrama de muestras de moléculas similares a anticuerpos tras la purificación a partir de líquido de cultivo. 7,5% PAAG, condiciones no reductoras.

M - marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

- 1 – 08-001;
- 2 – 08-002;
- 3 – 08-003;
- 4 – 08-004;
- 5 – 08-005;
- 6 – 08-006.

La figura 2 es un electroforegrama de muestras de moléculas similares a anticuerpos tras la purificación a partir de líquido de cultivo. 12% PAAG, condiciones reductoras.

M - marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

- 1 – 08-001;
- 2 – 08-002;
- 3 – 08-003;
- 4 – 08-004;
- 5 – 08-005;
- 6 – 08-006.

La figura 3 es un electroforegrama de muestras de moléculas similares a anticuerpos antes y después de la escisión por la proteasa GingisKHAN. 7,5% PAAG, condiciones no reductoras.

M - marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

- 1 - 08-001 muestra intacta;
- 2 - 08-001 tras la proteólisis;
- 3 - 08-002 muestra intacta;
- 4 - 08-002 tras la proteólisis;
- 5 - 08-003 muestra intacta;
- 6 - 08-003 tras la proteólisis.

La figura 4 es un electroforegrama de muestras de moléculas similares a anticuerpos antes y después de la escisión por la proteasa GingisKHAN. 7,5% PAAG, condiciones no reductoras.

M - marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

- 1 - 08-004 muestra intacta;
- 2 - 08-004 tras la proteólisis;
- 3 - 08-005 muestra intacta;
- 4 - 08-005 tras la proteólisis;
- 5 - 08-006 muestra intacta;
- 6 - 08-006 tras la proteólisis.

La figura 5 es un electroforegrama de muestras de moléculas similares a anticuerpos biespecíficas y monoespecíficas después de la escisión por la proteasa GingisKHAN. 7,5% PAAG, condiciones no reductoras.

M - marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

1 - molécula biespecífica similar a un anticuerpo que comprende dominios variables del anticuerpo Prolgolimab y del anticuerpo Ocrelizumab y una unidad de dimerización de dominios proximales de membrana de la proteína CD1b;

2 - molécula biespecífica de tipo anticuerpo que comprende dominios variables del anticuerpo Prolgolimab y del anti-CSF1R y una unidad de dimerización de dominios proximales de membrana de la proteína CD1b;

3 - anticuerpo Prolgolimab;

4 - molécula monoespecífica similar a un anticuerpo que comprende una unidad de dimerización basada en dominios proximales de membrana de la proteína CD1b y fragmentos variables del anticuerpo Prolgolimab;

5 - anticuerpo monoespecífico que comprende dominios variables del anticuerpo Ocrelizumab.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención. Estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como una restricción del alcance de la invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de la comprensión, será fácilmente aparente para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer a la misma ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o del alcance de las realizaciones anexas.

Materiales y métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. et al, *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos de biología molecular se utilizaron según los protocolos del fabricante.

Síntesis genética

Los segmentos génicos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos fabricados por síntesis química. Los segmentos génicos de 300 a 4.000 pb de longitud, que estaban flanqueados por sitios de restricción singulares, se ensamblaron mediante el recocido y la ligación de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron a través de los sitios de restricción especificados. Las secuencias de ADN de los fragmentos genéticos subclonados se confirmaron mediante la secuenciación del ADN.

Determinación de la secuencia de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de Sanger.

Análisis de secuencias de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencias

Se utilizó el paquete de software Ylab2 (Biocad) para la creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

Vectores de expresión

Se aplicaron variantes de plásmidos de expresión para la expresión transitoria de los anticuerpos, proteínas similares a los anticuerpos y antígenos en células eucariotas (por ejemplo, células CHO). Además del casete de expresión para una proteína objetivo, los vectores (plásmidos) contenían: un origen de replicación que permite la replicación de dicho plásmido en *E. coli*, genes que confieren resistencia en *E. coli* a diversos antibióticos (por ejemplo, a la ampicilina y a la kanamicina).

Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpos o moléculas similares a anticuerpos descritas anteriormente se generaron mediante PCR y/o síntesis génica y se ensamblaron mediante métodos y técnicas conocidos mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, utilizando sitios de restricción únicos en los vectores correspondientes. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonados se verificaron mediante la secuenciación del ADN. Las cantidades necesarias de plásmidos para la transfección transitoria se generaron en cultivos celulares de *E. coli* y se aislaron mediante técnicas conocidas.

Generación y purificación de antígenos recombinantes en cultivo en suspensión de células de mamífero

Las proteínas recombinantes se produjeron en células de líneas celulares establecidas obtenidas de células de ovario de hámster chino (línea CHO). El cultivo en suspensión se llevó a cabo en matraces en un incubadora con agitador orbital utilizando medios libres de suero suplementados con L-glutamina 8 mM y Pluronic 68 1 g/l . Para la expresión transitoria, se transfectaron células a una concentración de $2-2,2 \times 10^6$ células/ml utilizando polietilenimina lineal. 9 días después de la transfección, el líquido de cultivo se separó de las células por filtración a través de un filtro de 0,22 μ m.

Las proteínas marcadas con histidina se purificaron mediante cromatografía de quelatos metálicos. Las proteínas purificadas pasaron por filtros de 0,22 μ m y se almacenaron a -70 °C.

La pureza de la solución proteica resultante se evaluó mediante electroforesis en gel SDS, la electroforesis se realizó en PAAG desnaturizante al 12% en presencia de mercaptoetanol y en PAAG desnaturizante al 7,5% en ausencia de mercaptoetanol.

Producción de anticuerpos y proteínas similares a los anticuerpos en cultivos de suspensión de células de mamíferos

Los anticuerpos de control, moléculas similares a anticuerpos según la invención se produjeron en células de línea celular establecida obtenidas a partir de células de ovario de hámster chino (línea CHO). El cultivo en suspensión se llevó a cabo en matraces en una incubadora con agitador orbital utilizando medios libres de suero suplementados con L-glutamina 8 mM y Pluronic 68 1 g/l . Para la expresión transitoria, se transfectaron células a una concentración de $2-2,2 \times 10^6$ células/ml utilizando polietilenimina lineal (en lo sucesivo, PEI). La relación ADN/PEI fue de 1:3/1:10. 9 días después de la transfección, el líquido de cultivo se separó de las células por filtración a través de un filtro de lecho profundo de 0,5/0,22 μ m, y a continuación se midió el título de proteínas en ForteBio utilizando la metodología estándar. El líquido de cultivo clarificado se hizo pasar por una columna de sorbente de afinidad a la Proteína A entre 10 y 20 mg por ml del sorbente, la columna se equilibró con tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4). A continuación, se lavó la columna con 5 volúmenes de PBS para eliminar los componentes de unión no específica. La proteína unida se eluyó con un tampón de glicina 0,1 M (pH 3). Se recogió el pico principal de elución de proteínas y se ajustó a pH 6,0 con tampón Tris 1 M (pH 8). Todas las etapas se realizaron con un caudal de 110 cm/h. A continuación, la proteína se dializó en tampón acetato (pH 5,0), se filtró (0,22 μ m), se transfirió a tubos y se almacenó a -70 °C.

La pureza de la solución proteica resultante se evaluó mediante electroforesis en gel SDS en condiciones reductoras y no reductoras, así como mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño (SE HPLC).

La HPLC SE se realizó en una columna TSK-Gel G3000SWXL, de 7,8x300 mm, tamaño de partícula: 5 μ m, tamaño de poro: 250Å, y una precolumna TSK-Gel Guard SWxl.

Ejemplo 1. Selección de la sustitución del dominio CH1/CK en una molécula similar a un anticuerpo

Para garantizar una heterodimerización adecuada de las cadenas pesada y ligera en la molécula similar a un anticuerpo, uno de los dos pares de dominios CH1/CK se sustituyó por dominios estructuralmente idénticos de otras proteínas.

Esto dio como resultado una unidad de dimerización formada por: 1) Secuencia natural de $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 2) Dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de CD1b humana con mutaciones S12K y N59D y elongación GSC en el extremo C, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Esta unidad de dimerización dentro de la molécula similar al anticuerpo permitió producir moléculas similares a anticuerpos funcionales de suficiente pureza con dominios variables distintos (mostrados en los ejemplos siguientes), y también aumentó la estabilidad térmica de las moléculas y el rendimiento de una molécula similar a un anticuerpo correctamente ensamblada.

Ejemplo 2. Producción de constructos genéticos para la generación de moléculas similares a anticuerpos

Para producir construcciones que codifican secuencias de cadenas ligeras y pesadas del primer fragmento de unión al antígeno de la molécula similar al anticuerpo que se une específicamente a la primera diana, se generaron productos PCR que comprenden los genes de dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de la molécula similar al anticuerpo utilizando cebadores que comprenden sitios de restricción. El dominio variable de la cadena pesada se clonó en el vector pSXn-HChole-NR_VH1 utilizando sitios de restricción *Sall/XbaI*. El dominio variable de la cadena ligera se clonó en el vector pSXn-CL-BR_VL1 utilizando sitios de restricción *Sall/XbaI*.

Para producir estructuras que codifiquen secuencias de cadenas ligeras y pesadas del segundo fragmento de unión al antígeno de la molécula similar al anticuerpo que se une específicamente a la segunda diana, se sintetizaron construcciones que comprenden secuencias que codifican dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de la molécula similar al anticuerpo, fusionadas a dominios proximales de membrana de la proteína CD1b humana (<https://www.rcsb.org/structure/5w11>), incluyendo modificaciones.

La secuencia se sintetizó a partir de oligonucleótidos mediante PCR utilizando cebadores que comprendían sitios de restricción. El dominio variable de la cadena pesada con el primer dominio proximal de membrana de la secuencia CD1b humana, incluidas las modificaciones, se clonó en el vector pSX-FCKnob-PR utilizando sitios de restricción *Sall/XbaI*. El dominio variable de la cadena ligera con el segundo dominio proximal de membrana de la secuencia CD1b humana con o sin modificaciones se clonó en el vector pSX-HR utilizando sitios de restricción *Sall/XbaI*.

Los cuatro vectores anteriores se combinaron en la etapa de transfección para producir las moléculas similares a anticuerpos según la invención.

Las cantidades necesarias de todos los plásmidos mencionados se generaron en células *E. Coli* y se purificaron utilizando el kit Maxiprep Qiagen.

Ejemplo 3. Generación de moléculas similares a anticuerpos que comprenden la unidad de dimerización de la proteína CD1b humana

Para comprobar la universalidad del planteamiento objeto de estudio como solución de plataforma para ensamblar moléculas similares a anticuerpos utilizando cualquier par de fragmentos de unión a antígenos (en lo sucesivo, fragmentos variables de cadena ligera y pesada), elegimos tres pares aleatorios de fragmentos variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos conocidos (véase la Tabla 1) y los utilizamos para generar 6 moléculas similares a anticuerpos. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la productividad de las proteínas producidas. Las Figuras 1 y 2 muestran los resultados de la electroforesis en gel SDS de las muestras generadas en condiciones no reductoras y reductoras. Para las seis muestras en condiciones no reductoras existe una banda principal de aproximadamente 150 kDa, correspondiente a una molécula de longitud completa. En la Tabla 1 también se muestran los resultados de la pureza de la muestra según HPLC SE.

Tabla 1. Productividad y pureza de moléculas similares a anticuerpos producidas utilizando la unidad de dimerización del dominio $\alpha 3$ modificado de la proteína CD1b humana y la $\beta 2$ -microglobulina de la proteína CD1b humana.

Muestra	Primer par de fragmentos variables de cadena ligera y pesada dentro de Fab	Segundo par de fragmentos variables de las cadenas ligera y pesada y unidad de dimerización de la proteína CD1b humana	Productividad, día 9, mg/l	Pureza por HPLC SE		
				Agregados, %	Monómeros, %	Fragmentos, %
08-001	Prolgolimab	Ocrelizumab	218,2	5,4	93,6	1,0
08-002	Ocrelizumab	Prolgolimab	198,6	6,3	92,9	0,8
08-003	Prolgolimab	Anti-CSF1R	205,9	6,3	90,5	3,2
08-004	Anti-CSF1R	Prolgolimab	220,6	6,0	93,0	1,1
08-005	Ocrelizumab	Anti-CSF1R	161,7	6,8	91,5	1,6
08-006	Anti-CSF1R	Ocrelizumab	147,8	7,6	90,7	1,7

En consecuencia, las moléculas similares a anticuerpos con una unidad de dimerización según la invención que tienen varias combinaciones de fragmentos de unión a antígenos muestran una alta pureza y productividad.

Ejemplo 4. Determinación de la afinidad de moléculas tipo anticuerpo de longitud completa en Forte Bio Octet RED 384

Para confirmar que las moléculas similares a anticuerpos generadas no han perdido su capacidad de unión al antígeno, realizamos un análisis de afinidad en Forte Bio Octet RED 384. Para las moléculas

similares a anticuerpos 08-001 y 08-002, se midió la afinidad al dominio extracelular de la proteína PD-1 humana (hPD1ex-H6F) y al péptido biotinilado [NH₂]CEPANPSEKNSPSTQYCYSIQS[CH₂CH₂]biotina que comprende en la secuencia de aminoácidos un fragmento de la secuencia CD20 humana (en lo sucesivo denominado péptido CD20); para las moléculas similares a anticuerpos 08-003 y 08-004, se midió la afinidad con el dominio extracelular de la proteína PD-1 humana (hPD1ex-H6F) y con el dominio extracelular de la proteína CSF1R humana (hCSF1R_His); para las moléculas similares a anticuerpos 08-005 y 08-006, se midió la afinidad con el dominio extracelular de la proteína CSF1R humana (hCSF1R_His) y con el péptido CD20.

Como antígeno hCSF1R, utilizamos una secuencia de aminoácidos 20-512 (en lo sucesivo, AAs) de la proteína CSF1R humana (Receptor del factor 1 estimulante de colonias de macrófagos (Homo sapiens), UNIPROT ID P07333) con etiqueta His extremo C y etiqueta FLAG, peso molecular - 57,4 kDa. Como antígeno hPD-1ex-H6F, utilizamos una secuencia de AAs 21-170 de la proteína humana PD-1 (Proteína de muerte celular programada 1 (Homo sapiens), UNIPROT ID Q15116) con etiqueta His extremo C y etiqueta FLAG, peso molecular - 20,6 kDa.

Las secuencias genéticas que codifican antígenos se sintetizaron *de novo*, se clonaron en un vector de expresión, se generaron en células CHO y se purificaron mediante cromatografía de afinidad como se describe en los ejemplos generales.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una solución tampón cinética (denominada en lo sucesivo 1xKB); la fracción volumétrica de Tween 20 añadido fue del 0,1%; la fracción másica de ASB (albúmina sérica bovina) añadida fue del 0,1%; pH 7,4. Antes de la medición, los sensores ProA se regeneraron con una solución de glicina 50 mM y ácido clorhídrico, pH 1,8 (5 segundos en la solución regeneradora, 5 segundos en 1xKB, tres repeticiones).

En el caso de los antígenos hPD1ex-H6F y hCSF1R_His, los biosensores de proteína A (ProA) (ForteBio) se sumergieron en una solución con moléculas similares a anticuerpos a una concentración de 10 µg/ml durante 300 segundos para inmovilizarlos. La línea de base se registró en 1xKB durante 120 segundos. A continuación, los sensores cargados con la molécula similar al anticuerpo se sumergieron en pocillos que contenían una solución del antígeno diana (analito) en un tampón cinético durante 300 segundos. Las mediciones se realizaron para soluciones con analito hPD1ex-H6F a concentraciones de 10 µg/ml (485,4 nM), para soluciones con analito hCSF1R_His a concentraciones de 10 µg/ml (174,2 nM). A continuación, se detectó la disociación del complejo en 1xKB durante 600 segundos.

Los sensores de referencia pasaron por todos los pasos que siguieron los sensores utilizados para registrar los sensogramas del analito, con la excepción del paso de asociación - en el paso de asociación, los sensores se sumergieron en una solución de 1xKB sin analito (las señales del sensor de referencia se midieron en paralelo con el registro de los sensogramas principales). La señal de referencia se restó de la señal recibida en los sensores que interactuaron con el analito durante el procesamiento de los sensogramas.

Para comprobar la interacción inespecífica entre el analito y los sensores, utilizamos un sensor no cargado con molécula similar al anticuerpo (en el paso de carga, el sensor se sumergió en solución 1xKB;

todos los demás pasos son idénticos a los utilizados para el sensor cargado con molécula similar al anticuerpo).

En el caso del péptido CD20 biotinilado, el péptido a una concentración de 2,5 µg/ml se inmovilizó en la superficie de los sensores SAX (biosensores de estreptavidina de alta precisión (SAX), ForteBio) durante 300 segundos. El punto de referencia se registró en una solución 1xKB durante 120 segundos. A continuación, los sensores cargados con el péptido se sumergieron en pocillos que contenían la solución de molécula similar al anticuerpo (analito) en 1xKB durante 300 segundos. Las mediciones se realizaron para soluciones con analito (molécula similar al anticuerpo en el caso del péptido CD20) a concentraciones de 300 µg/ml y 75 µg/ml. La disociación del complejo se registró en 1xKB durante 60 segundos.

Todas las mediciones se realizaron a 30 °C y la velocidad de mezcla orbital fue de 1.000 revoluciones por minuto.

Para obtener los valores numéricos de las constantes cinéticas (kon es la constante de velocidad de activación/asociación, kdis es la constante de velocidad de disociación, KD es la constante de disociación de equilibrio o constante de afinidad), los sensogramas resultantes se procesaron según el modelo de interacción 1:1 utilizando Global Fit (selección de un conjunto de constantes kon, kdis, KD para analizar varios sensogramas de diferentes concentraciones) del software ForteBio Octet Data Analysis 9.0. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Constantes cinéticas kon, kdis, KD para la interacción entre moléculas tipo anticuerpo 08-001 - 08-006 y antígenos diana.

Molécula similar a un anticuerpo	Antígeno	KD (M)	kon (M ⁻¹ c ⁻¹)	kdis (c ⁻¹)	R ²
08-001	hPD1ex-H6F	1,59E-08	3,78E+04	6,01E-04	0,9214
	Péptido CD20	8,48E-07	1,64E+05	1,39E-01	0,9573
08-002	hPD1ex-H6F	1,69E-08	3,90E+04	6,58E-04	0,9223
	Péptido CD20	8,45E-07	1,17E+05	9,86E-02	0,9654
08-003	hPD1ex-H6F	1,24E-08	3,92E+04	4,87E-04	0,8971
	hCSF1R_His	1,44E-09	1,65E+05	2,38E-04	0,8795
08-004	hPD1ex-H6F	1,37E-08	4,14E+04	5,68E-04	0,8975
	hCSF1R_His	2,23E-09	1,99E+05	4,43E-04	0,9104
08-005	Péptido CD20	4,83E-07	1,20E+05	5,81E-02	0,9499
	hCSF1R_His	1,40E-09	1,81E+05	2,53E-04	0,8549

08-006	hCSF1R_His	1,92E-09	1,94E+05	3,72E-04	0,8812
	Péptido CD20	2,60E-06	1,61E+05	4,18E-01	0,9840

La Tabla 3 muestra los resultados de la verificación de la interacción inespecífica entre el analito y los sensores no cargados. No se detectó interacción inespecífica entre el analito y los sensores no cargados.

Tabla 3. Resultados de la verificación de la interacción inespecífica entre el analito y los sensores no cargados

Tipo de sensor	Analito	Concentración, nM	Señal, nm
ProA	hPD1ex-H6F	485,4	0,002
ProA	hCSF1R_His	174,2	0,0092
SAX	08-001	2000	0,0898
SAX	08-001	500	0,0044
SAX	08-002	2000	0,0228
SAX	08-002	500	0,0123
SAX	08-005	2001	0,0311
SAX	08-005	500	0,0062
SAX	08-006	2001	0,0078
SAX	08-006	500,3	0,004

A partir de los resultados proporcionados, todas las moléculas similares a los anticuerpos 08-001 - 08-006 demuestran una unión específica a los antígenos diana; además, los valores de KD tienen el mismo o similar orden de magnitud independientemente de la posición de los correspondientes fragmentos de unión al antígeno (como parte del fragmento Fab o como parte del fragmento similar a Fab que comprende la microglobulina $\beta 2$ y el dominio $\alpha 3$ modificado de la proteína CD1b en lugar de los dominios CK y CH1).

Ejemplo 5. Análisis de la unión simultánea de moléculas similares a anticuerpos según la invención a dos antígenos.

Se analizó la unión simultánea de las moléculas tipo anticuerpo 08-003 y 08-004 a dos antígenos diana distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His) en Forte Bio Octet RED 384. El experimento se llevó a cabo en sensores AR2G (biosensores de segunda generación reactivos de aminas (AR2G), ForteBio). Los pasos del experimento se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Etapas del experimento para verificar la unión simultánea de moléculas similares a anticuerpos según la invención a dos antígenos distintos

Nro.	Paso del experimento	Duración del paso (s)	Notas
1	Punto de referencia	60	Etapla auxiliar, equilibrio en el agua, verificación de la señal registrada en los sensores
2	Activación	300	Solución acuosa de activadores EDC (clorhidrato de 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) 20 mM y sNHS (N-hidroxisulfosuccinimida) 10 mM
3	Carga	300	Carga de la proteína hPD1ex-H6F (10 µg/ml) en solución tampón de acetato sódico 10 mM pH 5,0
4	Desactivación	300	Etanolamina 1 M pH 8,5. Desactivación de grupos activos sin reaccionar en la superficie del sensor
5	Punto de referencia 2	300	Equilibración de los sensores en la solución tampón cinética
6	Carga 2	300	La carga de la molécula similar al anticuerpo (10 µg/ml) en los sensores se debe a la interacción con el hPD1ex-H6F inmovilizado en el sensor.
7	Punto de referencia 3	15	Equilibrio de los sensores en la solución tampón cinética, verificación de la velocidad de disociación de la molécula similar al anticuerpo de los sensores.
8	Asociación	60	Interacción con hCSF1R_His (10 µg/ml)
9	Disociación	30	Paso auxiliar, confirma la ausencia de disociación rápida tras la unión al hCSF1R_His

Los sensores se activaron en una solución acuosa que contenía 20 mM EDC (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato) y 10 mM sNHS (*N-hidroxisulfosuccinimida*) durante 300 s. El antígeno (hPD1ex-H6F) se cargó en la superficie de los biosensores en un tampón de acetato sódico 10 mM, pH 5,0 durante 300 segundos. La concentración de proteína de carga fue de 10 µg/ml. Los centros activos sin reaccionar en las superficies del sensor se apagaron en una solución acuosa 1M de etanolamina, pH 8,5 durante 300 s. La línea de base en el quinto paso del experimento y todos los pasos posteriores se llevaron a cabo en una solución tampón cinética (1xKB); la fracción volumétrica de Tween 20 añadida fue del 0,1%; la fracción másica de ASB añadida fue del 0,1%; pH 7,4. Tras registrar la línea de base (paso 5), se cargó la molécula similar al anticuerpo en los sensores; la concentración de la molécula similar al anticuerpo cargada fue de 10 µg/ml (paso 6). A continuación, se registró el tercer punto de

referencia (paso 7). Este paso demuestra la ausencia de decaimiento rápido de la señal, lo que indica una interacción específica entre la molécula tipo anticuerpo cargada y el hPD1ex-H6F inmovilizado previamente en los sensores. En el siguiente paso de la asociación (paso 8), los sensores que contenían hPD1ex-H6F inmovilizado y moléculas similares al anticuerpo unidas se sumergieron en una solución de antígeno hCSF1R_His a una concentración de 10 µg/ml. La amplificación de la señal en este paso se debe a la presencia de un fragmento FAB del antígeno hCSF1R_His en moléculas similares a anticuerpos cargadas en los sensores.

Los sensogramas se analizaron con el software ForteBio Octet Data Analysis 9.0. Los principales resultados figuran en la Tabla 5. Según los resultados, las muestras 08-003 y 08-004 demuestran una unión simultánea a los antígenos hPD1ex-H6F y hCSF1R_His.

Tabla 5. Resultados del experimento para determinar la interacción simultánea de las moléculas similares a anticuerpos 08-003 y 08-004 con dos antígenos distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His).

Molécula similar a un anticuerpo	Paso 3		Paso 6		Paso 8		Notas
	Proteínas cargadas en sensores	Cambio en el nivel de la señal, nm	Interacción con una molécula similar a un anticuerpo	Cambio en el nivel de la señal, nm	Interacción con el segundo antígeno	Cambio en el nivel de la señal, nm	
08-003	hPD1ex-H6F (10 µg/ml)	2,1782	08-003	0,2481	hCSF1R_His (10 µg/ml)	0,0618	Interactúa simultáneamente con dos antígenos distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His)
		2,2164	08-003	0,205	1xKB	-0,0142	
08-004	hPD1ex-H6F (10 µg/ml)	2,1893	08-004	0,2248	hCSF1R_His (10 µg/ml)	0,0722	Interactúa simultáneamente con dos antígenos distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His)
		2,3321	08-004	0,2654	1xKB	-0,0141	
Control negativo		2,256	1xKB	-0,0422	hCSF1R_His (10 µg/ml)	0,0007	Ausencia de interacción

							inespecífica entre los dos antígenos
Control negativo	hPD1ex-H6F (10 µg/ml)	2,1903	1xKB	-0,0291	1xKB	-0,0051	No se observa crecimiento de la señal en ausencia de la molécula similar al anticuerpo y del segundo antígeno

Tras los resultados, las moléculas similares a anticuerpos 08-003 y 08-004 demuestran una unión simultánea a los antígenos hPD1ex-H6F y hCSF1R_His.

Ejemplo 6. Análisis de pesos moleculares de moléculas similares a anticuerpos según la invención mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución en fase inversa (UHPLC RP) con detección por espectrometría de masas.

Para confirmar el correcto ensamblaje de las moléculas, se analizaron los pesos moleculares de las moléculas similares al anticuerpo de longitud completa según la invención. Este método permite identificar moléculas similares a anticuerpos de longitud completa según la invención que constan de 4 cadenas distintas y distinguirlas de los subproductos formados a partir de otro conjunto de cadenas. Estos datos, junto con los datos de los Ejemplos 4 y 5, significan que la solución tecnológica basada en la sustitución de un par de dominios constantes CH1-CK por un par compuesto de $\beta 2$ microglobulina y dominio $\alpha 3$ modificado de la proteína CD1b humana proporciona un correcto ensamblaje de moléculas similares a anticuerpos según la invención.

El análisis se llevó a cabo utilizando el complejo de cromatografía-espectrometría de masas Agilent 1290 Infinity II UPLC-Agilent 6530 Q-Tof en la columna BioResolve Polyphenyl RP (2,1 x 50 mm, diámetro de partícula 2,7 µm; también se utilizó la precolumna BioResolve Polyphenyl RP, 2,1 x 5 mm, diámetro de partícula 2,7 µm). Antes del análisis, todas las moléculas fueron tratadas con la enzima PNGasa F (Promega) para eliminar los N-glicanos. Para ello, la enzima se diluyó con agua hasta alcanzar una concentración de 1 unidad de actividad en µl. La muestra con un contenido proteico de 50 µg se mezcló con una solución tampón, se añadió una solución de PNGasa F en la proporción enzima:proteína de 1 unidad : 50 µg, la mezcla se incubó en un termostato durante 18 horas a (37,0 ± 0,1) °C.

Para el análisis, se seleccionaron 5 µg de la solución de ensayo de acuerdo con las concentraciones de proteína medidas y se ajustó la concentración con la fase móvil A a 0,2 mg/ml. El volumen de entrada de la muestra fue de 5 µl.

Antes del análisis, el sistema cromatográfico se equilibró con una fase móvil a la proporción inicial de fases móviles A: 95%, B: 5% (la fase A contiene solución de ácido fórmico al 0,1% en agua, la fase B

contiene solución de ácido fórmico al 0,1%, acetonitrilo al 30% en alcohol isopropílico) durante al menos 30 min hasta que se alcanzó una presión estable. El espectrómetro de masas se calibró utilizando un estándar de calibración de acuerdo con las directrices del fabricante.

La muestra se separó a un caudal de 0,45 ml/min en gradiente de concentración de fase móvil B (5% a 30% de 2 a 3 minutos tras la introducción de la muestra, luego 30% a 35% de 3 a 8 minutos, luego 35 a 95% de 8 a 9 minutos) a una temperatura de columna de $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$; el cromatograma se obtuvo a una longitud de onda de 280 nm.

Los datos se procesaron en Protein Metrics.

Los resultados del análisis de masas para moléculas similares a anticuerpos según la invención se muestran en la Tabla 6. En la tabla, a cada molécula similar a un anticuerpo se le indica el porcentaje de masas correspondiente a una molécula similar a un anticuerpo correctamente ensamblada y formada por cuatro cadenas distintas en relación con todas las masas determinadas por el instrumento.

Tabla 6. Contenido de moléculas similares a anticuerpos correcta e incorrectamente ensambladas en muestras tratadas con la enzima PNGasa F.

Variantes de ensamblado	Muestra					
	08-001	08-002	08-003	08-004	08-005	08-006
Molécula tipo anticuerpo correctamente ensamblada, %.	94,4	97,4	97,8	88,3	100	91,3
molécula tipo anticuerpo ensamblada incorrectamente, %.	5,6	2,6	2,2	11,7	-	8,8

Los resultados del análisis permiten concluir que en todas las muestras predomina la masa de moléculas similares a anticuerpos de tamaño completo formadas por cuatro cadenas distintas.

Ejemplo 7. Confirmación del correcto ensamblaje de las moléculas similares a anticuerpos según la invención mediante proteólisis y análisis de masa de los fragmentos resultantes.

Para comprobar directamente el emparejamiento correcto de las cadenas ligeras y pesadas, las moléculas similares a anticuerpos según la invención fueron escindidas por la proteasa GingisKHAN (Genovis) cuyo sitio de reconocimiento está situado en la región bisagra de la molécula similar al anticuerpo (...KSCDK/THTCPPCP...). Dicha proteólisis da lugar a la descomposición de la molécula similar al anticuerpo de longitud completa en un fragmento Fc, un fragmento Fab y un fragmento tipo Fab que comprende la microglobulina $\beta 2$ y el dominio $\alpha 3$ modificado de la proteína CD1b humana en sustitución de los dominios CK y CH1. Los fragmentos de la molécula similar al anticuerpo se analizaron tras proteólisis mediante electroforesis vertical en condiciones no reductoras; asimismo, los fragmentos resultantes se sometieron a espectrometría de masas.

La mezcla de reacción de proteólisis contenía 40 µg de la molécula similar al anticuerpo y 40 unidades de la enzima GingisKHAN (a razón de 1 unidad de enzima : 1 µg de proteína) en un tampón compuesto por 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM de cisteína en un volumen de 60 µl. La reacción se llevó a cabo en un termostato a $(37,0 \pm 0,1)$ °C durante 1 hora y se detuvo añadiendo yodoacetamida a una concentración de 10 mM. Para la electroforesis, se añadió a las muestras resultantes un tampón que contenía SDS (hasta una concentración del 1% de SDS) y se realizó la electroforesis en gel de SDS en condiciones no reductoras.

Las Figuras 3-5 muestran los resultados de la electroforesis en gel SDS. Tras el tratamiento de las moléculas similares a anticuerpos (08-001 - 08-006) con la proteasa GingisKHAN (Figs. 3 y 4), se formaron 3 fragmentos principales, que se observaron en el electroforegrama en la región de 40-50 kDa y mostraron movilidades distintas en PAAG. Una molécula monoespecífica que comprende una unidad de dimerización de dominios proximales de membrana de la proteína CD1b humana y que comprende fragmentos variables del anticuerpo Prolgolimab (Fig. 5, carril 4), así como anticuerpos monoespecíficos en el formato IgG1 que comprenden fragmentos variables del anticuerpo Prolgolimab y del anticuerpo Ocrelizumab (Fig. 5, carriles 3, 5) también se trataron con la proteasa GingisKHAN. Como resultado de la comparación de las movilidades electroforéticas de los fragmentos formados durante la proteólisis de moléculas similares a anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos, se concluyó que el fragmento que muestra el nivel de movilidad más bajo corresponde al fragmento Fc, el que muestra un nivel de movilidad medio corresponde al fragmento Fab, y el fragmento que muestra el nivel de movilidad más alto corresponde al fragmento similar al Fab que comprende la microglobulina $\beta 2$ y el dominio $\alpha 3$ modificado de la proteína CD1b en sustitución de los dominios CK y CH1. En el caso de las moléculas similares a los anticuerpos 08-003 - 08-006, el electroforegrama mostró un fragmento adicional formado como resultado de la escisión inespecífica del dominio variable del fragmento anti-CSF1R. Para determinar las masas exactas de los fragmentos formados como resultado de la proteólisis, realizamos análisis de espectrometría de masas.

Antes del análisis por espectrometría de masas, las muestras, inmediatamente después de añadir yodoacetamida, se transfirieron a bicarbonato de amonio 50 mM, pH $(7,6 \pm 0,2)$, en columnas Zeba (MWCO 7 kDa) según las directrices del fabricante; a continuación, se añadió a las muestras PNGasa F a razón de 1 unidad de enzima : 50 µg de proteína y las muestras se termostataron durante 18 horas a $(37,0 \pm 0,1)$ °C.

El análisis de masa de los fragmentos resultantes se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 6 con los siguientes cambios: para lograr una mejor resolución de los picos, la muestra se separó a un caudal de 0,4 ml/min en un gradiente de concentración de la fase móvil B (5% a 55% de 2 a 20 minutos después de la introducción de la muestra, luego 55% a 95% de 20 a 21 minutos) a la temperatura de la columna (60 ± 1) °C; la fase A comprendía ácido fórmico al 0,1%, ácido trifluoroacético al 0,02% en agua, la fase B comprendía solución de ácido fórmico al 0,1%, acetonitrilo al 30% en alcohol isopropílico.

Los resultados de la UHPLC RP con detección por espectrometría de masas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Contenido de fragmentos en las muestras tratadas con las enzimas GingisKHAN y PNGase

F

Contenido en fragmentos, %.	Muestra					
	08-001	08-002	08-003	08-004	08-005	08-006
Fragmento Fab correctamente ensamblado	32,9	38,2	32,8	47,0	45,3	33,6
Fragmento similar a Fab correctamente ensamblado	46,0	44,6	39,9	26,3	29,0	38,1
Dímeros Fc-ojal y Fc-botón correctamente ensamblados	19,2	16,1	21,8	15,4	19,3	17,3
Homodímero Fc-ojal	0,5	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4
fragmentos similares a Fab ensamblados incorrectamente	0,7	-	-	0,1	-	1,7
Impurezas no identificadas						
36043 Da	-	-	-	3,2	-	3,2
36060 Da	-	-	-	7,2	-	5,4
37076 Da	-	-	4,5	-	5,4	-
49471 Da	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
49600 Da	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2

Los resultados muestran que todas las moléculas similares a anticuerpos según la invención se descompusieron tras la proteólisis en fragmentos correspondientes en masa a un fragmento Fc, un fragmento Fab y un fragmento similar a Fab que comprenden $\beta 2$ microglobulina y dominio $\alpha 3$ modificado de la proteína CD1b humana sustituyendo los dominios CK y CH1, significando que la solución tecnológica basada en la sustitución del par de dominios constantes CH1-CK por un par compuesto de $\beta 2$

microglobulina y dominio $\alpha 3$ modificado de la proteína CD1b humana proporciona un ensamblaje correcto de las moléculas similares a anticuerpos según la invención.

Resumen

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, específicamente a moléculas similares a anticuerpos que comprenden un heterodímero de dominios proximales de membrana de la proteína humana CD1b (grupo de diferenciación 1), así como a un proceso para producir dichas moléculas similares a anticuerpos. La invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica dicha molécula similar a anticuerpo, un vector de expresión, una célula huésped para producir dicha molécula similar a anticuerpo y a un método para producir dicha célula.

Reivindicaciones

1. Una molécula similar a un anticuerpo que se une específicamente a la primera y segunda dianas, en la que dicha molécula similar a un anticuerpo comprende:

1) un primer fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a la primera diana y comprende:

a) la cadena ligera del primer fragmento de unión a antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

y

b) la cadena pesada del primer fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende segundos (CH2) y terceros (CH3) dominios constantes de cadena pesada;

y

2) un segundo fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a la segunda diana y comprende:

(i) a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana (grupo de diferenciación 1) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

o

(ii) a) la cadena ligera del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que es el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

y

b) la cadena pesada del segundo fragmento de unión a antígeno, cuya cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que es $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un monómero de fragmento Fc que comprende segundos (CH2) y terceros (CH3) dominios constantes de cadena pesada;

en el que la microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$) de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el dominio $\alpha 3$ proximal a la membrana de la proteína CD1b humana con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 forman entre sí un heterodímero que está estabilizado por un enlace disulfuro.

2. La molécula similar a un anticuerpo según la reivindicación 1, en la que el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de otra cadena pesada entran en contacto a través de superficies

modificadas para formar la molécula similar a un anticuerpo, en la que dichas modificaciones en los dominios CH3 de las cadenas pesadas son sustituciones para permitir la heterodimerización.

3. La molécula similar a un anticuerpo según la reivindicación 2, en la que

a) el dominio CH3 de una cadena pesada, se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada que entra en contacto con la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada en la molécula similar a un anticuerpo, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, lo que conduce a la formación de un botón en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada que puede encajar en un ojal en la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada,

y

b) el dominio CH3 de otra cadena pesada se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada que entra en contacto con la superficie del dominio CH3 de la primera cadena pesada en la molécula similar a un anticuerpo, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor, lo que conduce a la formación de un ojal en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada capaz de encajar un botón en la interfaz del dominio CH3 de la primera cadena pesada;

en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona de un grupo que incluye arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W),

y en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de un grupo que incluye alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

4. La molécula similar a un anticuerpo según la reivindicación 1, en la que el primer dominio constante de la cadena ligera de la molécula similar al anticuerpo se selecciona entre CK o CL.

5. La molécula similar a un anticuerpo según la reivindicación 1, en la que los dominios CH3 de la molécula similar a un anticuerpo se modifican mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de modo que pueda formarse un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

6. La molécula similar al anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en la que el dominio CH3 de una cadena pesada se modifica para formar el botón (Knob), y el dominio CH3 de otra cadena pesada se modifica para formar el ojal (Hole), o viceversa.

7. La molécula similar a anticuerpo según la reivindicación 6, en la que el dominio CH3 de una cadena pesada tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W según el esquema de numeración UE para aminoácidos de anticuerpos, y el dominio CH3 de otra cadena pesada tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407V según el esquema de numeración UE para aminoácidos de anticuerpos.

8. La molécula similar a anticuerpo según la reivindicación 6, en la que el dominio CH3 de una cadena pesada tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407 según el esquema de numeración UE para aminoácidos de anticuerpos, y el dominio CH3 de otra cadena pesada tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W según el esquema de numeración UE para aminoácidos de anticuerpos.

9. La molécula similar al anticuerpo según la reivindicación 1, en la que el fragmento Fc pertenece a IgG.

10. La molécula similar al anticuerpo según la reivindicación 9, en la que el isotipo del fragmento Fc se selecciona del grupo: IgG1, IgG2 o IgG4 humanas.

11. La molécula similar al anticuerpo según la reivindicación 1, en la que el monómero de fragmento Fc comprende sustituciones que no conducen a propiedades ADCC, CDC y/o ADCP en la molécula similar al anticuerpo.

12. La molécula similar al anticuerpo según la reivindicación 11, en la que el monómero de fragmento Fc comprende sustituciones L234A y L235A según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

13. La molécula similar al anticuerpo según la reivindicación 1, en la que el monómero del fragmento Fc comprende sustituciones que conducen a una acción prolongada de la molécula similar al anticuerpo.

14. La molécula similar al anticuerpo según la reivindicación 13, en la que el monómero de fragmento Fc comprende sustituciones M252Y, S254T y T256E según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

15. La molécula similar al anticuerpo según la reivindicación 1, en la que el monómero de fragmento Fc comprende sustituciones que conducen a propiedades ADCC, CDC y/o ADCP mejoradas en la molécula similar al anticuerpo.

16. La molécula similar al anticuerpo según la reivindicación 15, en la que el monómero de fragmento Fc comprende la sustitución E345R según el esquema de numeración de la UE para aminoácidos de anticuerpos.

17. La molécula similar al anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que la primera y segunda dianas pueden seleccionarse cada una independientemente de un grupo que comprende: CD20, BCMA, PD-1, PD-L1, CD47, GD2, AXL, TGF beta, CSF1R, factor de coagulación sanguínea 9 (FIX), factor de coagulación sanguínea 10 (FX), TNF alfa, IL17A, IL17F o CD3.

18. La molécula similar al anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que la molécula similar al anticuerpo es una molécula similar al anticuerpo multiespecífica.

19. La molécula similar al anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que la molécula similar al anticuerpo es una molécula similar al anticuerpo biespecífica, trispecífica, tetraespecífica, pentaspecífica, hexaspecífica, heptaspecífica, octaspecífica o no específica.

20. La molécula similar a anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que la molécula similar al anticuerpo es una molécula similar al anticuerpo biespecífica bivalente.

21. Un ácido nucleico aislado que codifica la molécula similar al anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-20.

22. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 21, en el que el ácido nucleico es ADN.

23. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 21-22.

24. Un método para producir una célula huésped para producir la molécula similar al anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende la transformación celular por el vector según la reivindicación 23.

25. Una célula huésped para producir la molécula similar al anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende el ácido nucleico según las reivindicaciones 21-22.

26. Un método para producir la molécula similar al anticuerpo según las reivindicaciones 1-20, en el que el método comprende los siguientes pasos de:

a) transformar una célula huésped

- con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas del primer fragmento de unión al antígeno de la molécula similar al anticuerpo,

- con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas del segundo fragmento de unión al antígeno de la molécula similar al anticuerpo,

b) cultivo de la célula huésped en condiciones adecuadas para la síntesis de dicha molécula similar al anticuerpo; y

c) aislar dicha molécula similar a un anticuerpo a partir de un cultivo celular.

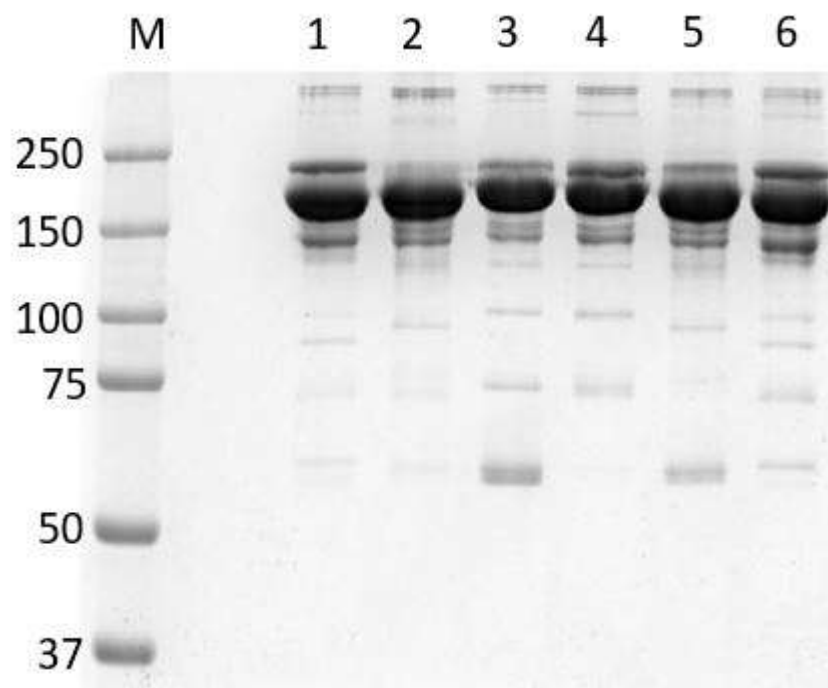


Figura 1

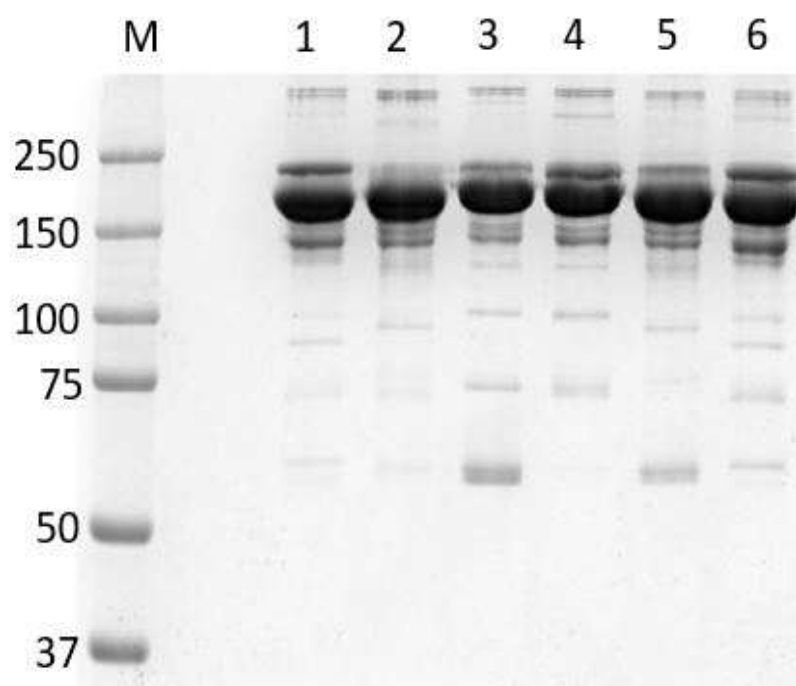


Figura 2

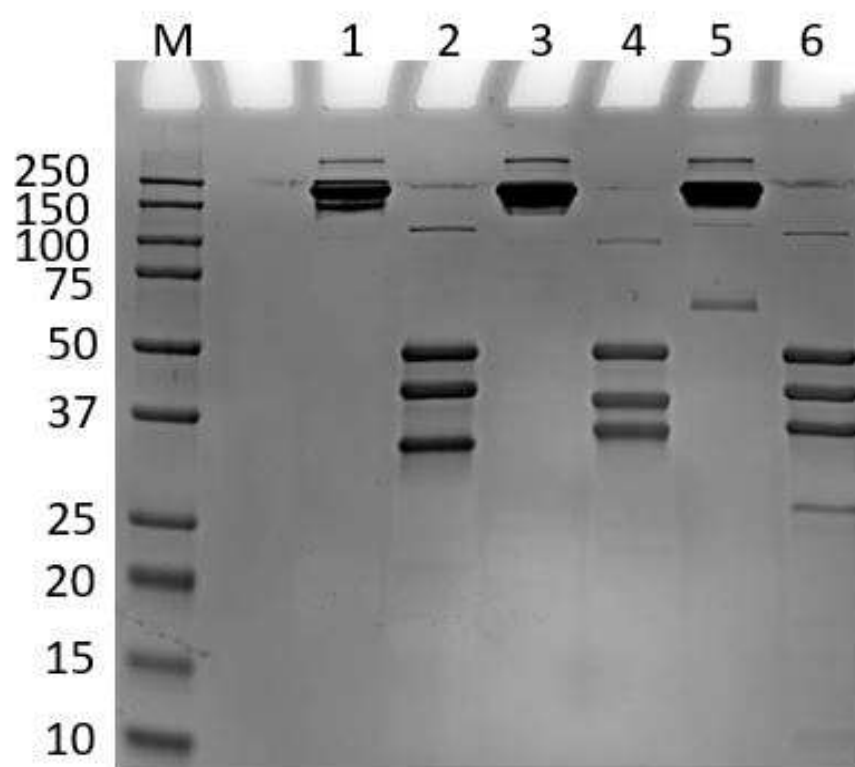


Figura 3

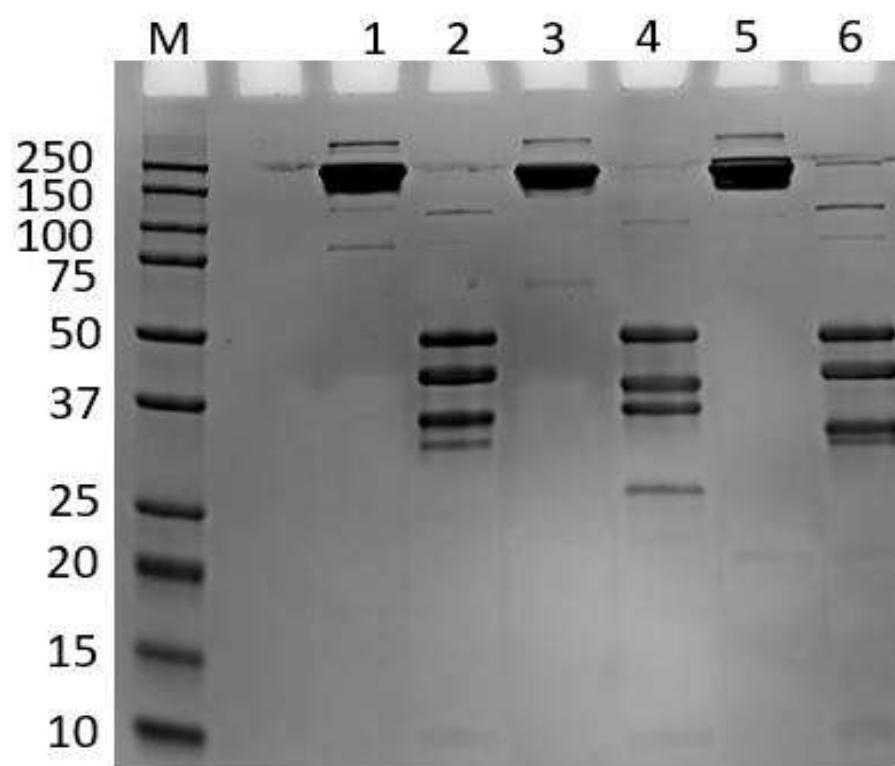


Figura 4

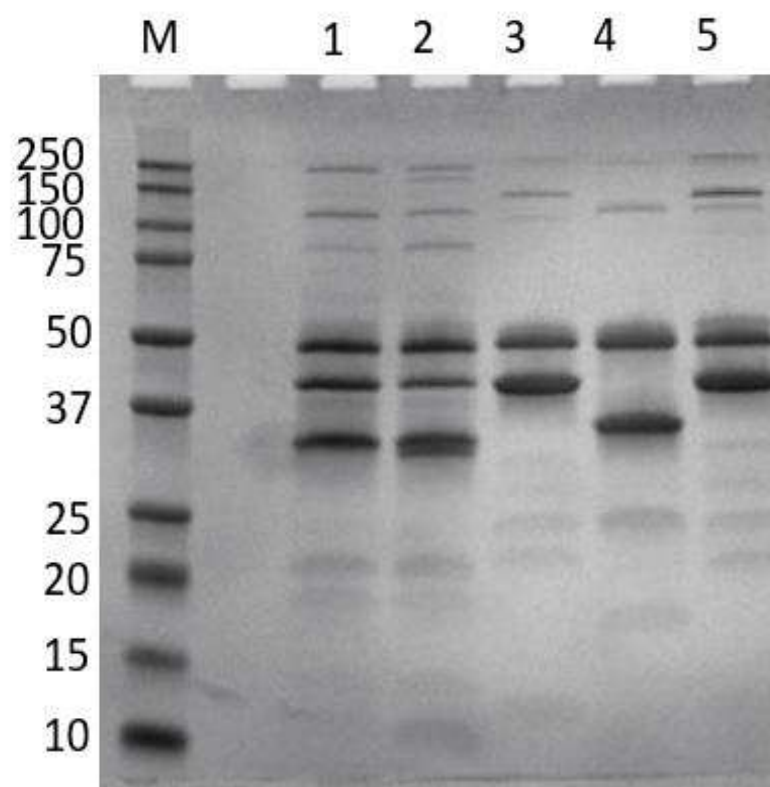


Figura 5

Nombre del proyecto: BCD-000_RU2023105130

Estado: generado Fecha

de creación: 2024-02-20

última modificación: 2024-02-20

Información general

Aplicación actual

Número de solicitud: después de

Oficina IP: RU
Número de solicitud: 2023105130
Fecha de presentación: 2023-03-06
Referencia del expediente del solicitante: BCD-000_AAV

Solicitud prioritaria más temprana

Oficina IP: RU
Número de solicitud: 2023105130
Fecha de presentación: 2023-03-06

Identificación de prioridades

Oficina IP	Número de solicitud	Fecha de presentación
RU	2023105130	2023-03-06

Título de la invención

Idioma	Título de la invención
en	Molécula similar a un anticuerpo que comprende un heterodímero de la proteína humana CD1b (grupo de diferenciación 1)

Solicitante e inventor:

Nombre del solicitante: Sociedad Anónima "BIOCAD"
Idioma: es
Nombre en latín: Sociedad Anónima "BIOCAD"
Dirección de residencia: Russian Federation, 198515, g. Saint Petersburg, vn. ter. g. poselok Strelna, ul. Svyazi, d. 38, str. 1, pomeshch. 89
Dirección para correspondencia: Russian Federation, 198515, g. Saint Petersburg, vn. ter. g. poselok Strelna, ul. Svyazi, d. 38, str. 1, pomeshch. 89

Secuencias

Secuencia 1: "BCD-000_RU2023105130_seq_1"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
98	AA	Homo sapiens	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la característica	Clasificaciones
--------------------------	--------------------------------	-----------------

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..98	mol_type = proteína organismo = Homo sapiens

Residuos

IQRTPKIQVY SRHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLL KNGERIEKVE HSDLFSKDW60

SFYLLYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTLSP KIVKWDRD98

Secuencia 2: "BCD-000_RU2023105130_seq_2"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
100	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..100	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QRQVKPEAWL SKGPSGPGR LQLVCHVSGF YPKPVVWMM RGEQEQQGTQ LGDILPNADW60

TWYLRATLDV ADGEAAGLSC RVKHSSLEGQ DIILYWRGSC100

Secuencia 3: "BCD-000_RU2023105130_seq_3"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
97	AA	Homo sapiens	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..97	mol_type = proteína organismo = Homo sapiens

Residuos

QRQVKPEAWL SSGPSGPGR LQLVCHVSGF YPKPVVWMM RGEQEQQGTQ LGDILPNANW60

TWYLRATLDV ADGEAAGLSC RVKHSSLEGQ DIILYWR97

Secuencia 4: "BCD-000_RU2023105130_seq_4"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
129	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..129	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMYWVRQV PGKGLEWVSA IDTGGGRITY
ADSVKGRFAI SRVNAKNTMY LQMNSLRAED TAVYYCARDE GGGTGWGVLK DWPYGLDAWG
QGTLVTVSS

60
120
129

Secuencia 5: "BCD-000_RU2023105130_seq_5"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
107	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..107	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QPVLTQPLSV SVALGQTARI TCGGNNIGSK NVHWYQOKPG QAPVLVIYRD SNRPSGIPER
FSGSNSGNTA TLTISRAQAG DEADYYCQVW DSSTAVFGTG TKLTVLQ

60
107

Secuencia 6: "BCD-000_RU2023105130_seq_6"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
122	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..122	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT SYNMHWVRQA PGKGLEWVGA IYPGNGDTSY
NQRFKGRFTI SVDKSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVV YYSNSYWFYD VWGQGTLVTV
SS

60
120
122

Secuencia 7: "BCD-000_RU2023105130_seq_7"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
106	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..106	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASSSVSMHWYQQKPKGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR60

FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQWFSNPPTFGQGTKVEIK106

Secuencia 8: "BCD-000_RU2023105130_seq_8"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
124	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..124	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

OQVLVESGGGLVRPGGSLRLSCAASEFTFDYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGSTNY60

ADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNISRAEDTALYYCASTVEVAHRRLYKYLEVWGQGTLLV120

TVSS124

Secuencia 9: "BCD-000_RU2023105130_seq_9"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
108	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..108	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QAGLTQPPSVSVAPGQTARTCGGNNIGSKSVHWYQQKPKGQAPVLVVYGDSDRPSGIPER60

FSGSNSGNTALTISRVEAGDEADYYCQWDISSDHVVFGGGTQLTVL108

Secuencia 10: "BCD-000_RU2023105130_seq_10"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
459	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..459	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QVQLVQSGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYWMYWVRQV	PGKGLEWVSA	IDTGGGRITY	60
ADSVKGRFAI	SRVNAKNTMY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDE	GGGTGWGVLK	DWPYGLDAWG	120
QGTLLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	180
TFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKRVEPK	SCDKTHTCPP	240
CPAPEAAGGP	SVFLFPPKPK	DTLYITREPE	VTCVVDVDSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	300
TKPREEQYNS	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	360
CTLPPSRDEL	TKNQVSLSCA	VKGFPSPDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL	DSDGSFFLV	420
KLTVDKSRWQ	QGNVFCSSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK			459

Secuencia 11: "BCD-000_RU2023105130_seq_11"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
214	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..214	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QPVLTQPLSV	SVALGQTARI	TCGGNNIGSK	NVHWYQOKPG	QAPVLVIYRD	SNRPSGIPER	60
FSGSNSGNTA	TLTISRAGAG	DEADYICQVW	DSSTAVFGTG	TKLTVLQRTV	AAPSVFIFPP	120
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	180
LSKADYEKKH	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC			214

Secuencia 12: "BCD-000_RU2023105130_seq_12"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
452	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..452	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	SYNMHWVRQA	PGKGLEWVGA	IYPGNQDTSY	60
NQKFKGRTFI	SVDKSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVV	YYSNSYWFYD	VWGQGLTVTV	120
DSIQRTPKIQ	VYSRHPAENG	KSNFLNCYVS	GFHPSDIEVD	LLKNGERIEK	VEHSDLSFSK	180
WDSFYLLYYT	EFTPTTEKDEY	ACRVNHVTTLS	QPKIVKWDNRD	EPKSCDKTHT	CPPCPAPEAA	240
GGPSVFLFPP	KPKDTLYITR	EPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	300
YNSTYRVSV	LTVLHQDWLN	GKEYCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPCR	360
DELTKNQVSL	WCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTT	PVLDSDGSFF	LYSKLTVDKS	420
RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK			452

Secuencia 13: "BCD-000_RU2023105130_seq_13"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
206	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..206	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASSSVS	YMHWYQOKPG	KAPKPLIYAP	SNLASGVPSR	60
FSGSGSGTDF	TLTISSLQPE	DFATYYCQOW	SFNPPTFGQG	TKVEIKQRQV	KPEAWLSKGP	120
SPGPGRLLQLV	CHVSGFYFKP	VWVMWMRGEQ	EQQGTQLGDI	LPNADWTWYL	RATLADVADGE	180
AAGLSRVKH	SSLEGQDIIL	YWRGSC				206

Secuencia 14: "BCD-000_RU2023105130_seq_14"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
452	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..452	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	SYNMHWVRQA	PGKGLEWVGA	IYPGNGDTSY	60
NQKFKGRFTI	SVDKSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVY	YYSNSYWFYD	VWGQGTLLTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKST	SGGTAALGCL	VKDYFPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ	180
SSGLYSLSV	VTVPSSSLGT	QTYICNVNHK	PSNTKVDKRV	EPKSCDKTHT	CPPCPAPEAA	240
GGPSVFLFPP	KPKDTLIYTR	EPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	300
YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYCKKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	POVCTLPSPR	360
DELTKNQVSL	SCAVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTFP	PVLDSGGSFF	LVSKLTVDKS	420
RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK			452

Secuencia 15: "BCD-000_RU2023105130_seq_15"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
213	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..213	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASSSVS	YMHWYQOKPG	KAPKPLIYAP	SNLASGVPSR	60
FSGSGSGTDF	TLTISSLQPE	DFATYYCQOW	SFNPPTFGQG	TKVEIKRTVA	APSVFIFFPS	120
DEQLKSGTAS	VVCLLNNEYP	REAKVQWKVD	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSTLTL	180
SKADYEKHKV	YACEVTHQGL	SSPVTKSFNR	GEC			213

Secuencia 16: "BCD-000_RU2023105130_seq_16"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
459	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..459	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QVQLVQSGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYWMYWVRQV	PGKGLEWVSA	IDTGGGRTTY	60
ADSVKGRFAI	SRVNAKNTMY	LQMSLRAED	TAVYYCARDE	GGGTGWGVLK	DWPYGLDAWG	120
OGTLVTVSSI	QRTPKIQVYS	RHPAENGKSN	FLNCYVSGFH	PSDIEVDLLK	NGERIEKVEH	180
SDLSFSKDWS	FYLLYYTEFT	PTEKDEYACR	VNHVTLSPK	IVKWDRDEPK	SCDKTHTCPP	240
CPAPEAAGGP	SVFLFPPKPK	DTLYITREPE	VTCTVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	300
TKPREEQYNS	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	360
YTLPPCRDEL	TKNQVSLWCL	VKGFPYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL	DSDGSFFFLYS	420
KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK			459

Secuencia 17: "BCD-000_RU2023105130_seq_17"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
207	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..207	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QPVLTQPLSV	SVALGQTARI	TCGGNNIGSK	NVHWYQOKPG	QAPVLVIYRD	SNRPSGIPER	60
FSGSNSGNTA	TLTISRAGAG	DEADYYCQVW	DSSTAVFGTG	TKLTVLQQRQ	VKPEAWLSKG	120
PSPGPGRLQL	VCHVSGFYPK	PVWVMWMRGE	QEQQGTQLGD	ILPNADWTWY	LRATLDVADG	180
EAAGLSRVK	HSSLEGQDII	LYWRGSC				207

Secuencia 18: "BCD-000_RU2023105130_seq_18"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
454	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..454	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QVQLVESGGG	LVRPGGSLRL	SCAASEFTFD	DYAMSWVRQA	PGKGLEWVSA	ISWNGGSTNY	60
ADSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TALYYCASTV	EVAHRRLYKY	LEVWGGGTLV	120
TVSSIQRTPK	IQVYSRHPAE	NGKSNFLNCY	VSGFHPSDIE	VDLLKNGERI	EKVEHSDLSF	180
SKDWSFYLLY	YTEFTPTEKD	EYACRVNHVT	LSQPKIVKWD	RDEPKSCDKT	HTCPCPCAPE	240
AAGGPSVFLF	PPKPKDTLYI	TREPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	300
EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	360
CRDELTKNQV	SLWCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	420
KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK			454

Secuencia 19: "BCD-000_RU2023105130_seq_19"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
208	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..208	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QAGLTQPPSV	SVAPGQTARI	TCGGNNIGSK	SVHWYQOKPG	QAPVLVVYGD	SDRPSGIPER	60
FSGSNSGNTA	TLTISRVEAG	DEADYYCQVW	DISSDHVVFG	GGTQLTVLQR	QVKPEAWLSK	120
GPSPGPGRLQ	LVCHVSGFYP	KPVWVMWMRG	EQEQQGTQLG	DILPNADWTW	YLRATLDDVAD	180
GEAAGLSRCV	KHSSLEGQDI	ILYWRGSC				208

Secuencia 20: "BCD-000_RU2023105130_seq_20"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
454	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..454	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QVQLVESGGG	LVRPGGSLRL	SCAASEFTFD	DYAMSWVRQA	PGKGLEWVSA	ISWNGGSTNY	60
ADSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TALYYCASTV	EVAHRRLYKY	LEVWGGGTLV	120
TVSSASTKGP	SVFPLAPSSK	STSGGTAALG	CLVKDYFPEP	VTVSWNSGAL	TSGVHTFPAV	180
LQSSGLYSLS	SVVTVPSSSL	GTQTYICNVN	HKPSNTKVDK	RVEPKSCDKT	HTCPCPCAPE	240
AAGGPSVFLF	PPKPKDTLYI	TREPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	300
EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVCTLPP	360
SRDELTKNQV	SLSCAVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLVSKLTVD	420
KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK			454

Secuencia 21: "BCD-000_RU2023105130_seq_21"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
215	AA	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..215	mol_type = proteína organismo = construcción sintética

Residuos

QAGLTQPPSV	SVAPGQTARI	TCGGNNIGSK	SVHWYQQKPG	QAPVLVVYGD	SDRPSGIPER	60
FSGSNSGNTA	TLTISRVEAG	DEADYYCOVW	DISSDHVVFG	GGTQLTVLRT	VAAPSVFIFP	120
PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF	YPREAKVQWK	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYSLSSTL	180
TLSKADYEKH	KVYACEVTHQ	GLSSPVTKSF	NRGEC			215

Secuencia 22: "BCD-000_RU2023105130_seq_22"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
1377	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..1377	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

cagggttcagc	tgggtgcagtc	tggggggaggc	ttggtgcagc	ctgggggggtc	tctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctgatt	caccttcagt	agctactgga	tgtattgggt	ccgccaggtt	120
ccaggggaag	ggctcgagtg	ggctctcagct	attgatactg	gtggtggtag	gacatactat	180
gcagactccg	tgaaggcccg	ggttcgccatc	tccagagtca	acgccaaaga	cacaatgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagatgaa	300
ggcgggggta	cgggttgggg	tgttttgaa	gattggccct	acggcttgga	cgcattgggc	360
caggggaccc	tggtcacctg	ctcctcagct	agcaccagg	gcccatcggt	cttccccctg	420
gcaccctcct	ccaagagcac	ctctgggggc	acagcggccc	tgggtgcct	ggtcaaggac	480
tacttccccc	aaccggtgac	gggtgtcgtg	aactcaggcg	ccctgaccag	cggcgtgcac	540
accttccccc	ctgtcctaca	ctctctcagg	ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgaccgtg	600
ccctccagca	gcttggggcac	ccagacctac	atctgcaacg	tgaatcacaa	gccagcaaac	660
accaaggtgg	acaagagagt	tgagcccaaa	tcttgtgaca	aaactcacac	atgccaccgg	720
tgcccagcac	ctgaagccgc	agggggaccg	tcagtcttcc	tcttcccccc	aaaacccaag	780
gacaccctct	acatcacccc	ggagcctgag	gtcacatgcg	tgggtggtga	cgtgagccac	840
gaagaccctg	aggtcaagtt	caactgggtac	gtggacggcg	tggaggtgca	taatgcccaag	900
acaaagcccg	gggaggagca	gtacaacagc	acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	960
ctgcaccagg	actggctgaa	tggcaaggag	tacaagtgc	aggtctccaa	caaagccctc	1020
ccagccccc	tcgagaaaac	catctccaaa	gccaaagggc	agccccgaga	accacaggtg	1080
tgcaccctgc	ccccatcccc	ggatgagctg	accaagaacc	aggtcagcct	gtcctgcgcc	1140
tccaaaaggct	tctatcccg	cgacatccgc	gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	1200
aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	gactccgacg	gctccttctt	cctcgtcagc	1260
aagctcaccg	tggacaagag	caggtggcag	caggggaacg	tcttctcatg	ctccgtgatg	1320
catgaggctc	tgcacaacca	ctacacgcag	aagagcctct	ccctgtcccc	gggtaaa	1377

Secuencia 23: "BCD-000_RU2023105130_seq_23"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
642	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..642	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

cagcctgtgc	tgactcagcc	actctcagtg	tcagtgggcc	tgggacagac	ggccaggatt	60
acctgtgggg	gaaacacat	tgggaagtaa	aatgtgcact	ggtaccagca	gaagccaggc	120
caggccctgt	tgctggtcat	ctatagggat	agcaaccggc	cctctgggat	ccctgagcga	180
ttctctggct	ccaactcggg	gaacacggcc	accctgacca	tcagcagagc	ccaagccggg	240

gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcagca ctgctgtctt cggaactggg 300
accaagctga ccgtcctaca gcgtacgggt gctgcaccat ctgctttcat cttcccgcga 360
cttgatgagc agttgaaatc tgggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttttat 420
ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcaccata gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcāaa cagactacga gaaacacāaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacāaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

Secuencia 24: "BCD-000_RU2023105130_seq_24"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
1356	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..1356	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

gaagtccaat tagtagaatc aggcggcgccg ttagtgcaac ccggtggctc actgcgtttg 60
agctgtgctg ctagtggcta tacctttacg tcctacaaca tgcattgggt gagacaagca 120
cctggcaagg gtctcgaatg ggtagggcgt atctatccag gaaatgggtg cactctttac 180
aaccagaagt ttaagggtcg ctttaccatc tcggtcgata agagcaagaa caccctgtac 240
ctacagatga attcgttacg ggcagaggac acagccgtct attactgcgc tcgggtggtg 300
tattactcca actcttactg gtacttcgac gtttggggcc agggaactct tgtgaccgtg 360
agctctatcc aacgcacacc aaagatccag gtctattcgc ggcattccgc agaaaacgga 420
aagagtaact tcctgaactg ctatgtatcg ggctttcatc caagtgatat cgagggtggac 480
ctgctgaaga acggagagag aatcgagaag gtggaacact cggacctgag cttctccaag 540
gactggagtt tctacctgct gtactatacc gagttcaccc cgacagaaaa ggacgaatac 600
gcatgtcggg tcaatcatgt caccctgagt cagccgaaaa tcgtaaaagt ggatcgggac 660
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagccgct 720
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcta catcaccggg 780
gaacctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccaag aagaccctga ggtcaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
tacaacagca cgtacgttgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgaccagga ctggctgaat 960
ggcaaggagt acaagtgcāa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccāt cgāgāāāacc 1020
atctccāaa ccaāagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc ccatgccgg 1080
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tgggtgcctg tcaāaggct ctatcccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gacāatggg cāgccggaga acaactāaa gaccaagcct 1200
cccgctcggg actccgāagg ctctctcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
agggtggcāg aggggāacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccāc 1320
tacacgcāga agāgcctctc cctgtccccc ggtaāa 1356

Secuencia 25: "BCD-000_RU2023105130_seq_25"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
618	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..618	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

gacattcaaa tgaccaaatc gccatcttctg ctttcagctt cggtaggaga tcgcgtaacc 60
attacatgcc gggcctcgtc ttccgtctctg tacatgcatt ggtatcagca aaaaccagga 120
aaagctccca aacccctgat ctacgcaccc tctaacctgg cttctggcgt cccgtcagag 180
ttttcgggtt ctggctctgg cacagacttt acacttacca tctcgtcgt gcagccagag 240
gattttgcca cctactactg tcagcaatgg tcttttaatc caccāacatt cggccagggg 300
accaaaagtā aaatcaāaca gagācāgggt aaaccagāgg catggctāāg tāāgggācct 360
tcacctggac ctggtagatt ācāatāgta tgtcatgtgt cgggatttta tcctāāacct 420
gtttgggtca tgtggatgā gggcgagcāā gagcagcaā gāacacagt aggcgacatc 480
ctggccgaatg cagactggac atggctactta agāgcāacc tggatgtag ggācgccgāā 540
gccgctggat tatcgtgccc ggtaāagcat tcgtcgctgg agggccaāga cātaāactc 600
tattggcgcg gtāgttgc 618

Secuencia 26: "BCD-000_RU2023105130_seq_26"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
1356	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..1356	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

gaagtccaat	tagtagaatc	aggcggcggc	ttagtgcaac	cgggtggctc	actgcgtttg	60
agctgtgctg	ctagtggcta	tacctttacg	tcctaacaaca	tgcattgggt	gagacaagca	120
cctggcaagg	gtctcgaatg	ggtagcgctc	atctatccag	gaaatgggtg	cacctcttac	180
aaccagaagt	ttaagggtcg	ctttaccatc	tcggtcgata	agagcaagaa	caccctgtac	240
ctacagatga	attcgtttacg	ggcagaggac	acagccgtct	attactgcgc	tcgggttgta	300
tattactcca	actcttactg	gtacttcgac	gtttggggcc	agggaaactc	tgtgacgctg	360
agctctgcta	gcaccaaggg	cccacggtc	ttccccctgg	cacctctctc	caagagcacc	420
tctggggcca	cagcgccctc	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg	480
gtgtctggga	actcaggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttccccgc	tgtcctacag	540
tcctcaggac	tctactccct	cagcagcgtg	gtgacgctgc	cctccagcag	cttgggcacc	600
cagacctaca	tctgtcaacgt	gaatcacaa	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagagagtt	660
gagcccaaat	cttgtgacaa	aactcacaca	tgccaccctg	gccagcaccc	tgaagccgca	720
ggggggaccgt	cagtccttct	cttcccccca	aaacccaagg	acacctctta	catcaccggg	780
gagcctgagg	tcacatgcgt	ggtgtgtggc	gtgagccaag	aagaccctga	ggtcaagtcc	840
aactgggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcct	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	900
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcacccgtc	tgcaccaggc	ctggtgtaat	960
ggcaaggagt	acaagtgcga	ggtctccaac	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaacc	1020
atctccaaga	ccaaagggga	gccccgagaa	ccacaggtgt	gcaccctgcc	cccattcccg	1080
gatgagctga	acaaagaacca	ggtcagcctg	tcctgcgccg	tcaaaggctt	ctatcccagc	1140
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaaatgg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	1200
cccgctgctg	actccgacgg	ctccttcttc	ctcgtcagca	agctcacctg	ggacaagagc	1260
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tcctgtgatg	atgaggctct	gcacaaccac	1320
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtccccg	ggtaaa			1356

Secuencia 27: "BCD-000_RU2023105130_seq_27"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
639	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..639	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

gacattcaaa	tgacccaatc	gccatcttct	ctttcagctt	cggtaggaga	tcgcgtaacc	60
attacatgcc	ggggcctcgt	ctcgtgtctg	tacatgcatt	ggtatcagca	aaaaaccagg	120
aaagctccca	aaacctgat	ctacgcaccc	tctaaccttg	cttctggcgt	cccgctcagg	180
ttttcgggtt	ctgggtcttg	cacagacttt	acacttaaca	tctcgctcgt	gcagccagag	240
gattttgcca	ctactactg	tcagcaaatg	tcttttaatc	caccaacatt	cggccagggg	300
accaaagtag	aaatcaaacg	tacggtggct	gcaccatctg	tcttcatctt	cccgccatct	360
gatgagcagt	tgaatcttgg	aaactgcctc	gttgtgtgct	tgtgtaataa	cttctatccc	420
agagagggca	aagtacagt	gaaggtggat	aacgcctctc	aatcggttaa	ctcccaggag	480
agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg	540
agcaaaagcag	actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	tcagggcctg	600
agctcgcccg	tcacaaagag	cttcaacagg	ggagagtgt			639

Secuencia 28: "BCD-000_RU2023105130_seq_28"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
1377	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..1377	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

cagggttcagc	tgggtgcagtc	tggggggaggc	ttgggtgcagc	ctgggggggtc	tctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctactgga	tgtattgggt	ccgccaggtt	120
ccagggaagg	ggctcgagtg	ggtctcagct	attgatactg	gtgggtggtag	gacatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	gttcgccatc	tccagagtca	acgcccaaga	cacaatgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggag	acggccgtgt	attactgtgc	gagagatgaa	300
ggcgggggta	cgggttgggg	tggtttgaa	gattggccct	acggcttgga	cgcatggggc	360
caggggaacc	tggtcacccg	ctcctcaatc	caacgcacac	caaagatcca	ggtctattcg	420
cggcataccg	cagaaaacgg	aaagagtaac	ttcctgaaac	gctatgtatc	gggctttcat	480
ccaagtata	tcgaggtgga	cctgctgaag	aacggagaga	gaatcgagaa	ggtggaacac	540
tcggacctga	gcttctccaa	ggactggagt	ttctacctgc	tgtactatac	cgagttcacc	600
ccgacagaaa	aggacgaata	cgcatgtcgg	gtcaatcatg	tcaccctgag	tcagccgaaa	660
atcgtaaagt	gggatcggga	cgagcccaaa	tcttgtgaca	aaactcacac	atgcccaccg	720
tgcccagcac	ctgaagccgc	tgggggaccg	tcagtcttcc	tcttcccccc	aaaacccaag	780
gacacccctc	acatcacccg	ggaacctgag	gtcacatgcg	tggtgggtgga	cgtagcccac	840
gaagaccctg	aggtcaagtt	caactgggtac	gtggacggcg	tggaggtgca	taatgccaag	900
acaaaagccg	gggaggagca	gtacaacagc	acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcacccgc	960
ctgcaccagg	actggtgtaa	tggcaaggag	tacaagtgca	aggtctccaa	caaagccctc	1020
ccagcccca	tcgagaaaac	catctccaaa	gccaaagggc	agccccgaga	accaacagtg	1080
tacacccctg	ccccatgccg	ggatgagctg	accaagaacc	aggtcagcct	gtggtgcctg	1140
gtcaaaaggct	tctatccag	cgacatcgcc	gtggaagtgg	agagcaatgg	gcagccggag	1200
aacaactaca	agaccacgcc	tccgtgtcgt	gactccgacg	gctccttctt	cctctatagc	1260
aagctcacg	tggacaagag	cagggtggcg	caggggaacg	tcttctcatg	ctccgtgatg	1320
catgaggctc	tgcacaacca	ctacacgcag	aagagcctct	ccctgtcccc	gggtaaa	1377

Secuencia 29: "BCD-000_RU2023105130_seq_29"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
621	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..621	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

cagcctgtggc	tgactcagcc	actctcagtg	tcagtggccc	tgggacagac	ggccaggatt	60
acctgtgggg	gaaacaacat	tggaagtaaa	aatgtgcact	ggtaccagca	gaagccaggc	120
caggcccccgt	tgctgtgcat	ctatagggat	agcaaccggc	cctctgggat	ccctgagcga	180
ttctctggct	ccaactcggg	gaacaacggc	accctgacca	tcagcagagc	ccaagccggg	240
gatgaggctg	actatctact	tcaggtgttg	gacagcagca	ctgctgtctt	cggaaactggg	300
accaagctga	ccgtcctaca	cgagagacag	gttaaaccag	aggcatggct	aagtaaggga	360
ccttcacctg	gacctggtag	attacaatta	gtatgtcatg	tgtcgggatt	ttatcctaaa	420
cctgttttgg	tcattgtggat	gaagggcgag	caagagcagc	aaggaaacaca	gttagggcac	480
atcctgcgga	atgcagactg	gacatgggtac	ttaagagcaa	ccctggatgt	agcggacggc	540
gaagccgctg	gattatcgtg	ccgggtaaa	cattcgtcgc	tggagggcca	agacataata	600
ctctattggc	gcggtagttg	c				621

Secuencia 30: "BCD-000_RU2023105130_seq_30"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
1362	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
--------------------------	--------------------------------	-----------------

	ística	
fuelle	1..1362	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

caagtccagt	tggttagaaa	cggcgagggt	ttggttaggc	cgggaggcag	cctgagatta	60
tctgtgacag	caagcgagtt	cacttttgat	gactatgcga	tgagttgggt	gcgacaagct	120
cctggaaaagg	gattggaatg	ggtgtcagcg	atctcatgga	atggcggatc	aactaactac	180
gcagattctgt	tcaagggcag	gtttaccatc	tcccgggata	acgcaaagaa	tagtctgtac	240
cttcaaatga	acagctcgcg	cgctgaggac	actgccttat	attattgcgc	aagcactgtg	300
gaagtagccc	accgacgggt	gtataagttac	ctcgaagtat	ggggtcaggg	aaactgtgtc	360
acagtaagct	caatccaacg	cacacaaaag	atccaggtct	attcgcgcca	tcgggcagaa	420
aacggaaaaga	gtaacttcct	gaactgtctat	gtatcgggct	ttcatccaag	tgatattcgag	480
gtggagctgc	tgaagaacgg	agagagaatc	gagaagggtg	aacactcggg	cctgagcttc	540
tccaaggact	ggagttttcta	cctgctgtac	tataccgagt	tcaccccgac	agaaaaggac	600
gaatacgcac	gtcgggtcaa	tcatgtcacc	ctgagtcagc	cgaaaatcgt	aaagtgggat	660
cgggacgagc	ccaaaatcttg	tgacaaaact	cacacatgcc	caccgtgccc	agcacctgaa	720
gccgctgggg	gaccgtcagt	cttcctcttc	ccccaaaac	ccaaggacac	cctctacatc	780
acccgggaac	ctgaggtcac	atgctgtggt	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgaggtc	840
aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	900
gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtggtc	agcgtctcca	ccgtctgca	ccaggactgg	960
ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaaggtc	tccaacaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	1020
aaaaccatct	ccaaagccaa	aggcgagccc	cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	1080
tgccgggatg	agctgaccaa	gaaccaggtc	agcctgtggt	gcctgggtcaa	aggctttctat	1140
cccagcgaca	tcgcccgtgga	aatgggagagc	aatgggagagc	cggagaacaa	ctacaagacc	1200
acgcctcccg	tgctggactc	cgacggctcc	ttcttctctc	atagcaagct	caccgtggac	1260
aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	tcattgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	1320
aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	tccccgggta	aa		1362

Secuencia 31: "BCD-000_RU2023105130_seq_31"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
624	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..624	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

caggcagggc	tgactcagcc	accctcggtg	tcagtggccc	caggacagac	ggccaggatt	60
acctgtgggg	gaaacaacat	tggaaagtaa	agtgtgcact	ggtaccagca	gaagccaggc	120
caggccctgt	tgctgtgtcg	ctatgtgtgat	agcgaccggc	cctcagggat	ccctgagcga	180
ttctctgtgt	ccaactcttg	gaacacggcc	accctgacca	tcagcagggt	cgaagccggg	240
gatgagggcg	actattactg	tcagggtgtg	gatattagta	gtgatcatgt	ggtattcggc	300
ggagggagcc	agctcacccg	tttacagaga	caggttaaac	cagaggcatg	gctaagtaag	360
ggacctcacc	ctggacctgg	tagattacaa	ttagtatgtc	atgtgtcggg	attttatcct	420
aaacctgttt	gggtcatgtg	gagcaagggc	gagcaaggag	agcaagggaac	acagttaggc	480
gacatcctcg	cgaatgcaga	ctggacatgg	tacttaagag	caaccctgga	tgtagcggac	540
ggcgaaagcc	ctggattatc	gtgcggggta	aagcattcgt	cgtcggaggg	ccaagacata	600
atactctatt	ggcgcggtag	ttgc				624

Secuencia 32: "BCD-000_RU2023105130_seq_32"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
1362	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..1362	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

caagtccagt	tggttagaaa	cggcgagggt	ttggttaggc	cgggaggcag	cctgagatta	60
tctgtgacag	caagcgagtt	cacttttgat	gactatgcga	tgagttgggt	gcgacaagct	120
cctggaaaagg	gattggaatg	ggtgtcagcg	atctcatgga	atggcggatc	aactaactac	180
gcagattctgt	tcaagggcag	gtttaccatc	tcccgggata	acgcaaagaa	tagtctgtac	240
cttcaaatga	acagctcgcg	cgctgaggac	actgccttat	attattgcgc	aagcactgtg	300
gaagtagccc	accgacgggt	gtataagttac	ctcgaagtat	ggggtcaggg	aaactgtgtc	360
acagtaagct	cagctagcac	caagggccca	tcggtctctc	ccctggcacc	ctcctccaag	420
agcacctctgt	ggggtcacagc	ggccctgggc	tgccctggta	aggactactt	ccccgaaccg	480
gtgacggtgt	cgtggaaactc	aggcgccctg	accagcggcg	tgcacacctt	cccggtctgc	540
ctacagtcct	caggactcta	ctccctcagc	agcgtgggtga	ccgtgccctc	cagcagcttg	600

ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
agagttgagc ccaaattcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 720
gccgcagggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccacaaac ccaaggacac cctctacatc 780
acccgggagc ctgaggtcac atgctgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccttgagggtc 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaaag ccctcccagc ccccatcgag 1020
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtgcac cctgccccca 1080
tcccgggatg agctgaccaa gaaccagggtc agcctgtcct gcgcctgcaa aggcttctat 1140
cccagcgaca tcgcccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctctg tcaagcaagct caccgtggac 1260
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtctcc tgatgcatga ggctctgcac 1320
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tcccgggta aa 1362

Secuencia 33: "BCD-000_RU2023105130_seq_33"

Longitud	Tipo de molécula	Organismo	Contiene ADN y ARN fragmentos	Secuencia omitida
645	ADN	construcción sintética	No	No

Características

Clave de características	Ubicación de la Característica	Clasificaciones
fuelle	1..645	mol_type = otro ADN organismo = construcción sintética

Residuos

caggcagggc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt 60
acctgtgggg gaaacaacat tggaaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
caggcccttg tgctgggtcgt ctatggtgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactcttg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatattagta gtgatcatgt ggtattcggc 300
ggagggaccc agctcacccgt tttacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gccctgtgtg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag agggccaaagt acagtggaaag gtggataaac ccctccaatc gggtactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaaag gacagcacct acagcctcag cagcaccccg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645