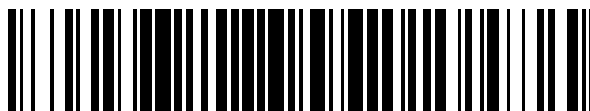


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 849**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09175437 .4**
96 Fecha de presentación: **24.03.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **2168984**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54 Título: **Anticuerpos humanos que se unen a IL-12 humana y métodos de producción**

30 Prioridad:
25.03.1999 US 126603 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.11.2012

73 Titular/es:
ABBOTT GMBH & CO. KG (100.0%)
MAX-PLANCK-RING 2
65205 WIESBADEN, DE

72 Inventor/es:
Salfeld, Jochen; Roguska, Michael;
Paskind, Michael; Banerjee, Subhashis;
Tracey, Daniel E; White, Michael;
Kaymakcalan, Zehra; Labkovsky, Boris;
Sakorafas, Paul; Friedrich, Stuart;
Myles, Angela; Veldman, Geertruida M;
Venturini, Amy; Warne, Nicholas W;
Widow, Angela; Elvin, John G;
Duncan, Alexander R; Derbyshire, Elaine J;
Carmen, Sara; Smith, Stephen;
Holtet, Thor Las y Du Pou, Sarah L.

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 390 849 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos que se unen a IL-12 humana y métodos de producción

5 Antecedentes de la invención

La interleucina 12 humana (IL-12) se ha caracterizado recientemente como una citocina con una estructura única y efectos pleiotrópicos (Kobayashi, *et al.* (1989) J. Exp Med. 170: 827-845; Seder, *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad Sci. 90: 10188-10192; Ling, *et al.* (1995) J. Exp Med. 154: 116-127; Podlaski, *et al.* (1992) Arch. Biochem. Biophys. 294:230-237). IL-12 desempeña un papel crítico en la patología asociada con varias enfermedades que implican respuestas inmunes e inflamatorias. Puede encontrarse una revisión de IL-12, sus actividades biológicas y su papel en enfermedad en Gately *et al.* (1998) Ann. Rev. Immunol. 16: 495-521.

Estructuralmente, IL-12 es una proteína heterodimérica que comprende una subunidad de 35 kDa (p35) y una subunidad de 40 kDa (p40) que se unen ambas entre sí mediante un puente disulfuro (denominada la "subunidad p70"). La proteína heterodimérica se produce principalmente por células presentadoras de antígenos tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Estos tipos celulares también secretan un exceso de la subunidad p40 en relación con subunidad p70. Las subunidades p40 y p35 no están relacionadas genéticamente y no se ha indicado que ninguna posea actividad biológica, aunque el homodímero p40 puede actuar como un antagonista de IL-12.

Funcionalmente, IL-12 desempeña un papel central en la regulación del equilibrio entre linfocitos T auxiliares de tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2) específicos de antígeno. Las células Th1 y Th2 gobiernan el inicio y progreso de trastornos autoinmunes, e IL-12 es crítica en la regulación de diferenciación y maduración de linfocitos Th1. Las citocinas liberadas por las células Th1 son inflamatorias e incluyen interferón γ (IFN γ), IL-2 y linfoxina (LT). Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 para facilitar inmunidad humoral, reacciones alérgicas e inmunosupresión.

De forma coherente con la preponderancia de respuestas Th1 en enfermedades autoinmunes y las actividades proinflamatorias de IFN γ , IL-12 puede desempeñar un papel principal en la patología asociada con muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias tales como artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS) y enfermedad de Crohn.

Los pacientes humanos con MS han demostrado un aumento de la expresión de IL-12 como se documenta por los niveles de ARNm de p40 en plaquetas de MS agudas. (Windhagen *et al.*, (1995) J. Exp. Med. 182: 1985-1996). Además, la estimulación *ex vivo* de células presentadoras de antígenos con linfocitos T que expresaban CD40L de pacientes con MS dio como resultado aumento de la producción de IL-12 en comparación con linfocitos T de control, coherente con la observación de que las interacciones CD40/CD40L son inductores potentes de IL-12.

Se han detectado niveles elevados de p70 de IL-12 en los sinovios de pacientes con RA en comparación con controles sanos (Morita *et al.* (1998) Arthritis and Rheumatism. 41: 306-314). El perfil de expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de citocinas en los sinovios de RA identificó citocinas predominantemente Th1. (Bucht *et al.*, (1996) Clin. Exp. Immunol. 103: 347-367). IL-12 también parece desempeñar un papel crítico en la patología asociada con enfermedad de Crohn (CD). Se ha observado expresión aumentada de IFN γ e IL-12 en la mucosa intestinal de pacientes con esta enfermedad (Fais *et al.* (1994) J. Interferon Res. 14: 235-238; Parronchi *et al.*, (1997) Am. J. Path. 150: 823-832; Monteleone *et al.*, (1997) Gastroenterology. 112: 1169-1178, y Berrebi *et al.*, (1998) Am. J. Path. 152: 667-672). El perfil de secreción de citocinas de linfocitos T de la lámina propia de pacientes con CD es característico de una respuesta predominantemente de Th1, incluyendo niveles de IFN γ muy elevados (Fuss, *et al.*, (1996) J. Immunol. 157: 1261-1270). Además, las secciones tisulares de colon de pacientes con CD muestran una abundancia de macrófagos que expresan IL-12 y linfocitos T que expresan IFN γ (Parronchi *et al.* (1997) Am. J. Path. 150: 823-832).

Debido al papel de IL-12 humana en una diversidad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de IL-12. En particular, se han buscado anticuerpos que se unan a, y neutralicen, IL-12 como un medio para inhibir la actividad de IL-12. Algunos de los anticuerpos más tempranos eran anticuerpos monoclonales murinos (mAb) secretados por hibridomas preparados a partir de linfocitos de ratones inmunizados con IL-12 (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Mundial N° WO 97/15327 de Strober *et al.*; Neurath *et al.* (1995) J. Exp. Med. 182: 1281-1290; Duchmann *et al.* (1996) J. Immunol. 26: 934-938). Estos anticuerpos de IL-12 murinos se limitaron con respecto a su uso *in vivo* debido a problemas asociados con la administración de anticuerpos de ratón a seres humanos, tales como semivida en suero corta, una incapacidad para desencadenar ciertas funciones efectoras humanas e inducción de una respuesta inmune no deseada contra el anticuerpo de ratón en un ser humano (la reacción de "anticuerpo anti-ratón humano" (HAMA)).

En general, los intentos para superar los problemas asociados con uso de anticuerpos completamente murinos en seres humanos, han implicado modificar por ingeniería genética los anticuerpos para que sean más "de tipo humano". Por ejemplo, se han preparado anticuerpos quiméricos, en los que las regiones variables de las cadenas

de anticuerpo son derivadas de ratón y las regiones constantes de las cadenas de anticuerpo son derivadas de seres humanos (Junghans, *et al.* (1990) Cancer Res. 50: 1495-1502; Brown *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 2663-2667; Kettleborough *et al.* (1991) Protein Engineering. 4: 773-783). Sin embargo, debido a que estos anticuerpos quiméricos y humanizados aún conservan algunas secuencias murinas, aún pueden inducir una reacción inmune no deseada, la reacción de anticuerpo anti quimérico humano (HACA), especialmente cuando se administran durante periodos prolongados.

Carter, *et al.* (1997) Hybridoma, vol. 16, n.º 4, páginas 363-369 presentan un método para producir anticuerpos murinos para la subunidad p40 de IL-12. La Publicación Nº WO 96/33735 describe el uso de la tecnología XenoMouse para producir anticuerpos humanos para la citocina humana IL-8.

Un agente inhibidor de IL-12 preferido para anticuerpos murinos o derivados de los mismos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados) sería un anticuerpo anti IL-12 completamente humano, puesto que un agente tal no debería inducir la reacción HAMA, incluso si se usa durante periodos prolongados. Sin embargo, tales anticuerpos no se han descrito en la técnica y, por lo tanto, aún se necesitan.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se disocia de IL-12 humana con una tasa K_{off} constante de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, e inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menos. Más preferiblemente, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, se disocia de IL-12 humana con una tasa K_{off} constante de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, e inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o menos. Aún más preferiblemente, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, se disocia de IL-12 humana con una tasa K_{off} constante de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, e inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ o menos.

En una realización, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene las siguientes características:

- a) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 9; y
- b) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 10.

En la realización anterior, preferiblemente el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene además una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 11; y tiene una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 12. En la realización anterior, preferiblemente el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene además una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 13; y tiene una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 14. En la realización anterior, preferiblemente el anticuerpo humano aislado tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 15; y tiene una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 16.

En otra realización, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo,

- a) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 404-SEC ID Nº: 469; y
- b) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 534-SEC ID Nº: 579.

En la otra realización anterior, preferiblemente el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene además una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 335-SEC ID Nº: 403; y una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 506-SEC ID Nº: 533. En la otra realización anterior, preferiblemente el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene además una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 288-SEC ID Nº: 334; y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 470-SEC ID Nº: 505.

En una realización adicional, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo,

- a) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 25; y
- b) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 26.

En la realización adicional anterior, preferiblemente el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene además una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº:

27; y una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28. En la realización adicional anterior, preferiblemente el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene además una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29; y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30. En una realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32.

En la realización preferida anterior, preferiblemente el anticuerpo aislado humano comprende una región constante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en regiones constantes de IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE. Se analizan variaciones alélicas de las mismas en Kabat *et al.* (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242). Más preferiblemente, la región constante de cadena pesada del anticuerpo es IgG1. En la realización preferida anterior, preferiblemente el anticuerpo humano aislado es un fragmento Fab, o un fragmento F(ab')₂ o un fragmento Fv de cadena sencilla.

La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humano, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, comprendiendo el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25. Preferiblemente, el anticuerpo codificado, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27. Más preferiblemente, el anticuerpo codificado, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29. Aún más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31. La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humano, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, comprendiendo el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26. Preferiblemente, el anticuerpo codificado, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28. Más preferiblemente, el anticuerpo codificado, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30. Aún más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32.

En otro aspecto, la invención proporciona vectores de expresión recombinantes que portan los ácidos nucleicos que codifican anticuerpo de la invención, y células hospedadoras en las que se han introducido tales vectores también están abarcadas por la invención, así como métodos para preparar los anticuerpos de la invención cultivando las células hospedadoras de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo, de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente la composición comprende además un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir actividad de IL-12 humana *in vitro* que comprende poner en contacto IL-12 humana con el anticuerpo de la invención, por ejemplo, J695, de modo que se inhiba la actividad de IL-12 humana.

En otro aspecto, la invención proporciona un uso de un anticuerpo de la invención, por ejemplo, J695, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para preparar un medicamento para tratar o prevenir un trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis, esclerodermia, tiroiditis, enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, púrpura Henoch-Schönlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, síndrome de Sjögren, uveítis, sepsis, choque séptico, síndrome de sepsis, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, miastenia grave, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, enfermedades fibróticas pulmonares, anemia hemolítica, tumores malignos, insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio por administración al sujeto humano. El trastorno puede ser, por ejemplo, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple o artritis reumatoide.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B muestran alineamientos de secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada de una serie de anticuerpos humanos que se unen a IL-12 humana en comparación con secuencias de línea germinal C os-3/JH3 y Dpl18 Lv10 42. Se usa la numeración de Kabat para identificar posiciones de aminoácidos. Para la Joe 9 de tipo silvestre, se muestra la secuencia completa. Para los otros anticuerpos solo se muestran las posiciones de aminoácidos que difieren de Joe 9 de tipo silvestre.

Las Figuras 1C-1D muestran los alineamientos de secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera de una serie de anticuerpos humanos que se unen a IL-12 humana. Se usa la numeración de Kabat para identificar posiciones de aminoácidos. Para la Joe 9 de tipo silvestre, se muestra la secuencia completa. Para los otros anticuerpos solo se muestran las posiciones de aminoácidos que difieren de Joe 9 de tipo silvestre.

Las Figuras 2A-2E muestran las posiciones de CDR en la cadena pesada del anticuerpo Y61 que se mutaron por mutagénesis dirigida y las sustituciones de aminoácidos respectivas en cada posición. Los gráficos a la derecha de las figuras muestran las tasas de disociación para los anticuerpos sustituidos (barras negras) en comparación con Y61 no mutado (barra abierta).

Las Figuras 2F-2H muestran las posiciones de CDR en la cadena ligera del anticuerpo Y61 que se mutaron por mutagénesis dirigida y las sustituciones de aminoácidos respectivas en cada posición. Los gráficos a la derecha de las figuras muestran las tasas de disociación para los anticuerpos sustituidos (barras negras) en comparación con Y61 no mutado (barra abierta).

La Figura 3 demuestra la eficacia *in vivo* del anticuerpo humano anti-IL-12 J695, en los niveles de neopterin en plasma en monos cynomolgus.

La Figura 4 muestra una gráfica de puntuación artrítica media frente a días después de inmunización de ratones con colágeno, que demuestra que el tratamiento con C1 7.15 reduce significativamente los síntomas relacionados con la artritis en comparación con el tratamiento con IgG de rata.

Descripción detallada de la invención

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos.

La expresión “resto de aminoácido que potencia la actividad” incluye un resto aminoácido que mejora la actividad del anticuerpo. Debería entenderse que el resto de aminoácido que potencia la actividad puede reemplazar a un resto de aminoácido en una posición contacto, hipermutación o de mutagénesis selectiva preferida y, además, puede estar presente más de un resto de aminoácido potenciador de actividad dentro de una o más CDR. Un resto de aminoácido potenciador de actividad incluye un resto de aminoácido que mejora la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo, por ejemplo anticuerpo anti-IL-12 humana que se une a IL-12 humana. El resto de aminoácido potenciador de actividad también pretende incluir un resto aminoácido que mejore la potencia de neutralización de un anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo de IL-12 humana que inhibe IL-12 humana.

El término “anticuerpo” incluye una molécula de inmunoglobulina comprendida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marcoconservadas (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino terminal a carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR 1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o “parte de anticuerpo”) incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-12). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de una rama sencilla de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, estos pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite prepararse como una cadena proteica sencilla en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos, también están abarcadas. Los

diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que se expresan dominios VH y VL en una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Además, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen uso de la región núcleo de estreptavidina para realizar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S. M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101) y uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C terminal para preparar moléculas scFV bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Pueden prepararse partes de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, pueden obtenerse anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante convencionales, como se describen en este documento. Las partes de unión a antígeno preferidas son dominios completos o pares de dominios completos.

El término "retromutación" se refiere a un proceso en el que algunos o todos los aminoácidos mutados de forma somática de un anticuerpo humano se reemplazan con los restos de línea germinal correspondientes de una secuencia de anticuerpo de línea germinal homóloga. Las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo humano de la invención se alinean de forma separada con las secuencias de línea germinal en la base de datos VBASE para identificar las secuencias con la mayor homología. Las diferencias en el anticuerpo humano de la invención se devuelven a la secuencia de línea germinal mutando posiciones de nucleótidos definidas que codifican dicho aminoácido diferente. El papel de cada aminoácido identificado de este modo como candidato para retromutación debería investigarse con respecto a un papel directo o indirecto en un ion de antígeno y cualquier aminoácido que se descubra después de la mutación que afecta a cualquier característica deseable del anticuerpo humano no debería incluirse en el anticuerpo humano final; como ejemplo, los aminoácidos potenciadores de actividad identificados por el enfoque de mutagénesis selectiva no se someterán a retromutación. Para minimizar el número de aminoácidos sometidos a retromutación las posiciones de aminoácidos que se descubren que son diferentes de la secuencia de línea germinal más cercana pero idénticas al aminoácido correspondiente en una segunda secuencia de línea germinal pueden permanecer, siempre que la segunda secuencia de línea germinal sea idéntica y colineal a la secuencia de anticuerpo humano de la invención para al menos 10, preferiblemente 12 aminoácidos, en ambos lados del aminoácido en cuestión. La retromutación puede producirse en cualquier etapa de optimización de anticuerpos; preferiblemente, la retromutación se produce directamente antes o después del enfoque de mutagénesis selectiva. Más preferiblemente la retromutación se produce directamente antes del enfoque de mutagénesis selectiva.

La frase "interleucina humana 12" (a breviada en este documento como IL-12 o IL-12), como se usa en este documento, incluye una citocina humana que se secreta principalmente por macrófagos y células dendríticas. La expresión incluye una proteína heterodimérica que comprende una subunidad de 35 kD (p35) y una subunidad de 40 kD (p40) que se unen ambas entre sí con un puente disulfuro. La proteína heterodimérica se denomina una "subunidad p70". La estructura de IL-12 humana se describe adicionalmente en, por ejemplo, Kobayashi, *et al.* (1989) *J. Exp. Med.* 170: 827-845; Seder, *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10188-10192; Ling, *et al.* (1995) *J. Exp. Med.* 154: 116-127; Podlaski, *et al.* (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 294: 230-237. La expresión IL-12 humana pretende incluir IL-12 humano recombinante (rh IL-12), que puede prepararse por métodos de expresión recombinante convencionales.

Las expresiones "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "etiquetado de Kabat" se usan de forma intercambiable en este documento. Estas expresiones, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácidos que son más variables (es decir hipervariables) que otros restos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190: 382-391 y Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2 y posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

La numeración de Kabat se usa en este documento para indicar las posiciones de modificaciones de aminoácidos realizadas en anticuerpos de la invención. Por ejemplo, el anticuerpo Y61 anti IL-12 puede mutarse de serina (S) a ácido glutámico (E) en la posición 31 de la CDR1 de cadena pesada (H31S → E), o la glicina (G) puede mutarse a tirosina (Y) en la posición 94 de la CDR3 de cadena ligera (L94G → Y).

La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana como se describe en Kabat *et al.* (Véase Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human

Services, Publicación de NIH N° 91-3242). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Las mutaciones se introducen preferiblemente usando el "enfoque de mutagénesis selectiva" descrito en este documento. El anticuerpo humano puede tener al menos una posición reemplazada con un resto de aminoácido, por ejemplo, un resto de aminoácido potenciador de actividad que no se codifica por la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. El anticuerpo humano puede tener hasta veinte posiciones reemplazadas con restos de aminoácidos que no son parte de la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. En otras realizaciones, se reemplazan hasta diez, hasta cinco, hasta tres o hasta dos posiciones. En una realización preferida, estos reemplazos están dentro de las regiones CDR como se describe en detalle posteriormente. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco conservadas humanas.

La frase "anticuerpo humano recombinante" incluye anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula hospedadora (descrito adicionalmente en la Sección II, posteriormente), anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante (descrita adicionalmente en la Sección III, posteriormente), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo, Taylor, L. D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (Véase Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242). En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y de este modo las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos recombinantes son el resultado de enfoque de mutagénesis selectiva o retromutación o ambos.

Un "anticuerpo aislado" incluye un anticuerpo que es tá sustancialmente si no otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-12 está sustancialmente sin anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hIL-12). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-12 puede unirse a moléculas de IL-12 de otras especies (analizado en más detalle posteriormente). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente sin otros materiales y/o compuestos químicos celulares.

Un "anticuerpo neutralizador" (o un "anticuerpo que neutralizó la actividad de hIL-12") incluye un anticuerpo cuya unión a hIL-12 da como resultado inhibición de la actividad biológica de hIL-12. Esta inhibición de la actividad biológica de hIL-12 puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de hIL-12, tal como inhibición de proliferación de blastos por fitohemaglutinina humana en un ensayo de proliferación de blastos por fitohemaglutinina (PHA), o inhibición de unión al receptor en un ensayo de unión del receptor de IL-12 humano (véase Ejemplo 3-Ensayo de Inducción de Interferón gamma). Estos indicadores de actividad biológica de hIL-12 puede evaluarse por uno o más de varios ensayos *in vitro* o *in vivo* convencionales conocidos en la técnica (véase Ejemplo 3).

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo para un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-12 que se une a un antígeno IL-12 y/o la potencia de neutralización de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-12 cuya unión con hIL-12 inhibe la actividad biológica de hIL-12, por ejemplo inhibición de proliferación de blastos por PHA o inhibición de unión con el receptor en un ensayo de unión con receptor de IL-12 humano (véase Ejemplo 3).

La frase "resonancia de plasmón superficial" incluye un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante detección de alteraciones en las concentraciones proteicas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Ejemplo 5 y Jonsson, U., *et al.* (1993) Ann. B. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U., *et al.* (1991) Biotechniques 11: 620-627; Jonsson, B., *et al.* (1995) J. Mol. Recognition 8:125-131; y Johnson, B., *et al.* (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

El término " K_{off} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno.

El término " K_d ", como se usa en este documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

La frase “molécula de ácido nucleico” incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

La frase “molécula de ácido nucleico aislada”, como se usa en este documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpo (por ejemplo, VH, VL, CDR3) que se une a hIL-12 incluyendo “anticuerpos aislados”, incluye una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o parte de anticuerpo están sin otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpo que se unen a antígenos distintos de hIL-12, pudiendo dichas otras secuencias flanquear de forma natural el ácido nucleico en ADN genómico humano. Por lo tanto, por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención que codifica una región VH de un anticuerpo anti IL-12 no contiene otras secuencias que codifiquen otras regiones VH que se unan a antígenos distintos de IL-12. La frase “molécula de ácido nucleico aislada” también pretende incluir secuencias que codifican anticuerpos bivalentes, biespecíficos, tales como diacuerpos en los que las regiones VH y VL no contienen otras secuencias distintas de las secuencias del diacuerpo.

El término “vector” incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Varios vectores se denominan en este documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma de vector usada más habitualmente. Sin embargo, se pretende que la invención incluya tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

La frase “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”) incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que tales términos pretenden referirse no solamente a la célula objeto particular sino a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión “célula hospedadora” como se usa en este documento.

El término “modificar”, como se usa en este documento, pretende referirse a cambiar uno o más aminoácidos en los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos. El cambio puede producirse añadiendo, sustituyendo o suprimiendo un aminoácido en una o más posiciones. El cambio puede producirse usando técnicas conocidas, tales como mutagénesis de PCR.

La frase “posición de contacto” incluye una posición de aminoácido en la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo que está ocupada por un aminoácido que entra en contacto con antígeno en una de las 26 estructuras de anticuerpo-antígeno conocidas. Si un aminoácido de CDR en cualquiera de las 26 estructuras resueltas conocidas de complejos anticuerpo-antígeno entra en contacto con el antígeno, entonces puede considerarse que ese aminoácido ocupa una posición de contacto. Las posiciones de contacto tienen una mayor probabilidad de ocuparse por un aminoácido que entra en contacto con un antígeno que posiciones no de contacto. Preferiblemente una posición de contacto es una posición de CDR que contiene un aminoácido que entra en contacto con antígeno en más de 3 de las 26 estructuras (> 11,5%). Más preferiblemente una posición de contacto es una posición de CDR que contiene un aminoácido que entra en contacto con antígeno en más de 8 de las 25 estructuras (>32%).

La expresión “posición de hipermutación” incluye un resto de aminoácido que ocupa la posición en la región CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo que se considera que tiene una alta frecuencia o probabilidad de hipermutación somática durante maduración de afinidad *in vivo* de un anticuerpo. “Alta frecuencia o probabilidad de hipermutación somática” incluye frecuencias o probabilidades de una probabilidad de 5 a aproximadamente 40% de que el resto experimente hipermutación somática durante maduración de afinidad *in vivo* del anticuerpo. Debería entenderse que se pretende que todos los intervalos dentro de este intervalo indicado sean parte de la presente invención, por ejemplo, de 5 a aproximadamente 30%, por ejemplo, de 5 a aproximadamente 15%, por ejemplo de 15 a aproximadamente 30%.

La expresión “posición de mutagénesis selectiva preferida” incluye un resto de aminoácido que ocupa una posición en la región CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera que puede considerarse que es una posición tanto de contacto como de hipermutación.

La frase “enfoque de mutagénesis selectiva” incluye un método para mejorar la actividad de un anticuerpo seleccionando y mutando individualmente aminoácidos de CDR en al menos una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de hipermutación y/o de contacto. Un anticuerpo humano “mutado de forma selectiva” es un anticuerpo que contiene una mutación en una posición seleccionada usando un enfoque de mutagénesis selectiva.

En otra realización, se pretende que el enfoque de mutagénesis selectiva proporcione un método para mutar preferentemente restos de aminoácidos individuales seleccionados en la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada (en lo sucesivo en este documento H1, H2 y H3, respectivamente), o la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena ligera (en lo sucesivo en este documento denominadas L1, L2 y L3, respectivamente) de un anticuerpo. Los restos de aminoácidos pueden seleccionarse de posiciones de mutagénesis selectiva preferida, posiciones de contacto o posiciones de hipermutación. Los aminoácidos individuales se seleccionan basándose en su posición en la región variable de cadena ligera o pesada. Debería entenderse que una posición de hipermutación también puede ser una posición de contacto. En una realización, el enfoque de mutagénesis selectiva es un “enfoque dirigido”. La expresión “enfoque dirigido” pretende incluir un método para mutar preferentemente restos de aminoácidos individuales seleccionados en la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o la CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo de una manera dirigida, por ejemplo, un “enfoque dirigido por grupos” o “enfoque dirigido por CDR”. En el “enfoque dirigido por grupos”, se dirigen a restos de aminoácidos individuales en grupos particulares mutaciones selectivas incluyendo grupos I (incluyendo L3 y H3), II (incluyendo H2 y L1) y III (incluyendo L2 y H1), enumerándose los grupos en orden de preferencia para dirección. En el “enfoque dirigido por CDR”, se dirigen a restos de aminoácidos individuales en CDR particulares mutaciones selectivas con el orden de preferencia para dirección como sigue: H3, L3, H2, L1, H1 y L2. El resto de aminoácido seleccionado se muta, por ejemplo, a al menos otros dos restos de aminoácidos, y se determina el efecto de la mutación en la actividad del anticuerpo. La actividad se mide como un cambio en la especificidad/afinidad de unión del anticuerpo, y/o potencia de neutralización del anticuerpo. Debería entenderse que el enfoque de mutagénesis selectiva puede usarse para la optimización de cualquier anticuerpo derivado de cualquier fuente incluyendo presentación de fagos, animales transgénicos con genes de línea germinal de IgG humana, anticuerpos humanos aislados de linfocitos B humanos. Preferiblemente, el enfoque de mutagénesis selectiva se usa en anticuerpos que no pueden optimizarse más usando tecnología de presentación de fagos. Debería entenderse que los anticuerpos de cualquier fuente incluyendo presentación de fagos, animales transgénicos con genes de línea germinal de IgG humana, anticuerpos humanos aislados de linfocitos B humanos pueden someterse a retromutación antes de o después del enfoque de mutagénesis selectiva.

La expresión “resto de aminoácido potenciador de actividad” incluye un resto de aminoácido que mejore la actividad del anticuerpo. Debería entenderse que el resto de aminoácido potenciador de actividad puede reemplazar un resto de aminoácido en una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o una posición de hipermutación y, además, puede estar presente más de un resto de aminoácido potenciador de actividad dentro de una o más CDR. Un resto de aminoácido potenciador de actividad incluye un resto de aminoácido que mejora la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo, por ejemplo un ion de anticuerpo anti IL-12 humana con IL-12 humana. También se pretende que el resto de aminoácido potenciador de actividad incluya un resto de aminoácido que mejore la potencia de neutralización de un anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo de IL-12 humana que inhibe IL-12 humana.

Se describen diversos aspectos de la invención en más detalle en las siguientes subsecciones.

1. Anticuerpos humanos que se unen a IL-12 humana

La presente invención proporciona anticuerpos humanos aislados, o parte de un ion a antígeno de los mismos, de acuerdo con la reivindicación 1. Preferiblemente, los anticuerpos humanos de la invención son anticuerpos anti hIL-12 humanos neutralizadores, recombinantes. Los anticuerpos de la invención que se unen a IL-12 humana pueden seleccionarse, por ejemplo, explorando una o más bibliotecas de ADNc de V_L y V_H humanos con hIL-12, tal como por técnicas de presentación de fagos como se describe en el Ejemplo 1. La exploración de bibliotecas de ADNc de V_L y V_H humanas identificó inicialmente una serie de anticuerpos anti IL-12 de los que un anticuerpo, denominado en este documento “Joe 9” (o “Joe 9 de tipo silvestre”), se seleccionó para desarrollo adicional. Joe 9 es un anticuerpo de IL-12 humana de afinidad relativamente baja (por ejemplo, una K_{off} de aproximadamente $0,1 \text{ s}^{-1}$), pero es útil para unirse específicamente a y detectar hIL-12. La afinidad del anticuerpo Joe 9 se mejoró realizando mutagénesis de las CDR de cadena pesada y ligera, produciendo un panel de regiones variables de cadena ligera y pesada que se “mezclaron y emparejaron” y se mutaron adicionalmente, con duciendo a numerosos anticuerpos anti hIL-12 adicionales con afinidad aumentada para hIL-12 (véase Ejemplo 1, Tabla 2 (véase Apéndice A) y los alineamientos de secuencia de las Figuras 1A-D).

De estos anticuerpos, el anticuerpo anti hIL-12 humano denominado en este documento Y61 demostró una mejora significativa en la afinidad de unión (por ejemplo, una K_{off} de aproximadamente $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). El anticuerpo Y61 anti hIL-12 se seleccionó para maduración de afinidad adicional mutando individualmente restos de aminoácidos específicos dentro de las CDR de cadena pesada y ligera. Los restos de aminoácidos de Y61 se seleccionaron para mutación específica de sitio (enfoque de mutagénesis selectiva) basándose en el resto de aminoácido que ocupa una posición de mutagénesis selectiva preferida, contacto y/o una posición de hipermutación. Se muestra un resumen de las sustituciones en posiciones seleccionadas en las CDR de cadena pesada y ligera en las Figuras 2A-

2H. Un anticuerpo neutralizador recombinante preferido de la invención, denominado en este documento J695, resultó de una sustitución de Gly a Tyr en la posición 50 de la CDR2 de cadena ligera de Y61, y una sustitución de Gly a Tyr en la posición 94 de la CDR3 de cadena ligera de Y61.

- 5 Se muestran alineamientos de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un panel de anticuerpos anti IL-12 de la invención, en el linaje de Joe 9 de tipo silvestre a J695, en las Figuras 1A-1D. Estos alineamientos de secuencias posibilitaron la identificación de secuencias consenso para regiones variables de cadena pesada y ligera preferidas de anticuerpos de la invención que se unen a hIL-12, así como secuencias consenso para las CDR3, CDR2 y CDR1, en el linaje de Joe 9 a J695. Además, el análisis de mutagénesis de Y61 resumido en las Figuras 2A-2H posibilitó la identificación de secuencias consenso para regiones variables de cadena pesada y ligera que se unen a hIL-12, así como secuencias consenso para las CDR3, CDR2 y CDR1 que se unen a hIL-12 en el linaje de Y61 a J695 que abarca secuencias con modificaciones de Y61 pero que conservan buenas características de unión a hIL-12. Se resumen a continuación secuencias de CDR, VH y VL preferidas de la invención (incluyendo secuencias consenso) como se identifican por identificadores de secuencia en la Lista de Secuencias adjunta.

SEC ID N°:	CADENA DE ANTICUERPO	REGIÓN	SECUENCIA
1	Joe 9 consenso a J695	CDRH3	(H/S)-G-S-(H/Y)-D-(N/T/Y)
2	Consenso Joe 9 a J695	CDRL3	Q-(S/T)-Y-(D/E)-(S/R/K)-(S/G/Y)- (L/F/T/S)-(R/S/T/W/H)-(G/P)-(S/T/A/L)-(R/S/M/T/L)- (V/I/T/M/L)
3	Joe 9 consenso a J695	CDRH2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G
4	Joe 9 consenso a J695	CDRL2	(G/Y)-N-(D/S)-(Q/N)-R-P-S
5	Joe 9 consenso a J695	CDRH1	F-T-F-S-(S/E)-Y-G-M-H
6	Joe 9 consenso a J695	CDRL1	(S/T)-G-(G/S)-(R/S)-S-N-I-(GA)-(S/A)-(N/GA')-(T/D)-V- (K/H)
7	Joe 9 consenso a J695	VH	(secuencia de VH completa; véase lista de secuencias)
8	Joe 9 consenso a J695	VL	(secuencia de VL completa; véase lista de secuencias)
9	Y61 consenso a J695	CDRH3	H-(G/V/C/H)-(S/T)-(H/TA/R/I)-(D/S)-(N/K/A/T/S/F/W/H)
10	Y61 consenso a J695	CDRL3	Q-S-Y-(D/S)-(Xaa)-(G/D/Q/L/F/R/H/N/Y)-T-H-P-A-L-L
11	Y61 consenso a J695	CDRH2	(F/T/Y)-I-(R/A)-Y-(D/S/E/A)-(G/R)-S-(Xaa)-K-(Y/E)-Y-A-D-S- V-K-G
12	Y61 consenso a J695	CDRL2	(G/Y/S/T/N/Q)-N-D-Q-R-P-S
13	Y61 consenso a J695	CDRH1	F-T-F- (Xaa) - (Xaa) - (Y/H) -(G/M/A/N/S)-M-H
14	Y61 consenso a J695	CDRL1	S-G-G-R-S-N-I-G-(S/C/R/N/D/T)-(N/M/I)-(T/Y/D/H/K/P)-V-K
15	Y61 consenso a J695	VH	(secuencia de VH completa; véase lista de secuencias)
16	Y61 consenso a J695	VL	(secuencia de VL completa; véase lista de secuencias)
17	Y61	CDRH3	H-G-S-H-D-N
18	Y61	CDRL3	Q-S-Y-D-R-G-T-H-P-A-L-L
19	Y61	CDRH2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G
20	Y61	CDRL2	G-N-D-Q-R-P-S
21	Y61	CDRH1	F-T-F-S-S-Y-G-M-H
22	Y61	CDRL1	S-G-G-R-S-N-I-G-S-N-T-V-K
23	Y61	VH	(secuencia de VH completa; véase lista de secuencias)
24	Y61	VL	(secuencia de VL completa; véase lista de secuencias)
25	J695	CDRH3	H-G-S-H-D-N
26	J695	CDRL3	Q-S-Y-D-R-Y-T-H-P-A-L-L
27	J695	CDRH2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G
28	J695	CDRL2	Y-N-D-Q-R-P-S

SEC ID N°:	CADENA DE ANTICUERPO	REGIÓN	SECUENCIA
29	J695	CDRH1	F-T-F-S-S-Y-G-M-H
30	J695	CDRL1	S-G-S-R-S-N-I-G-S-N-T-V-K
31	J695	VH	(secuencia de VH completa; véase lista de secuencias)
32	J695	VL	(secuencia de VL completa; véase lista de secuencias)

Los anticuerpos producidos a partir de la maduración de afinidad de Joe 9 de tipo si lvestre se caracterizaron funcionalmente por análisis de resonancia de plasmón superficial para determinar la velocidad K_{off} y K_{on} . Se produjo una serie de anticuerpos que tenían una velocidad K_{off} dentro de un intervalo de aproximadamente $0,1 \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, y más preferiblemente una K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos. Los anticuerpos también se caracterizaron *in vitro* con respecto a su capacidad para inhibir la proliferación de blastos por fitohemaglutinina (PHA), como se describe en el Ejemplo 3. Se produjo una serie de anticuerpos que tenían un valor de CI_{50} en el intervalo de aproximadamente $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-11} \text{ M}$, más preferiblemente aproximadamente $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ a $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ o menos.

En consecuencia, en un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo humano aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une a IL-12 humana y se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad K_{off} de $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos, como se determina por resonancia de plasmón superficial, o que inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de proliferación de blastos por fitohemaglutinina *in vitro* (ensayo PHA) con una CI_{50} de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ o menos. Preferiblemente, el anticuerpo de IL-12 humana aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la presente descripción se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o menos, o inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ o menos. Preferiblemente, el anticuerpo de IL-12 humana aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la presente descripción se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, o inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o menos. De acuerdo con la invención, el anticuerpo de IL-12 humana aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, o inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menos. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo de IL-12 humana aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, se disocia de IL-12 humana con una tasa K_{off} constante de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, o inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o menos. En realizaciones aún más preferidas, el anticuerpo de IL-12 humana aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad K_{off} de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, o inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ o menos.

La constante de tasa de disociación (K_{off}) de un anticuerpo de IL-12 puede determinarse por resonancia de plasmón superficial (véase Ejemplo 5). Generalmente, el análisis de resonancia de plasmón superficial mide interacciones de unión en tiempo real entre ligando (IL-12 humana recombinante inmovilizada en una matriz biosensora) y analito (anticuerpos en solución) por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). También puede realizarse análisis de plasmón superficial inmovilizando el analito (anticuerpos en una matriz biosensora) y presentando el ligando (IL-12 recombinante en solución). La actividad de neutralización de anticuerpos de IL-12, o partes de unión a antígeno de los mismos, puede evaluarse usando uno o más de varios ensayos *in vitro* adecuados (véase Ejemplo 3).

Se conoce bien en la técnica que las CDR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo desempeñan un papel importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno. En consecuencia, esta descripción proporciona anticuerpos humanos que tienen CDR de cadena ligera y pesada de Joe 9, así como otros anticuerpos que tienen CDR que se han modificado para mejorar la especificidad/afinidad de unión del anticuerpo. Como se demuestra en el Ejemplo 1, una serie de modificaciones de las CDR de cadena ligera y pesada da como resultado una duración de afinidad de anticuerpos anti hIL-12 humanos. Los alineamientos de secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera y pesada de una serie de anticuerpos humanos que varían de Joe 9 de tipo si lvestre a J695 que se une a IL-12 humana se muestran en las Figuras 1A-1D. Pueden determinarse motivos de secuencia consenso para las CDR de anticuerpos del alineamiento de secuencias (como se resume en la tabla anterior). Por ejemplo, un motivo consenso para la CDR3 de VH del linaje de Joe 9 a J695 comprende la secuencia de aminoácidos: (H/S)-G-S-(H/Y)-D-(N/T/Y) (SEC ID N°: 1), que abarca aminoácidos desde la posición 95 a la 102 de la HCVR mostrada en SEC ID N°: 7. Un motivo consenso para la CDR de VL comprende la secuencia de aminoácidos: Q-(S/T)-Y-(D/E)-(S/R/K)-(S/G/Y)-(L/F/T/S)-(R/S/T/W/H)-(G/P)-(S/T/A/L)-(R/S/M/T/L-V/I/T/M/L) (SEC ID N°: 2), que abarca aminoácidos de la posición 89 a 97 de la LCVR consenso mostrada en SEC ID N°: 8.

En consecuencia, en otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características:

- a) inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ o menos;

- b) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1; y
- c) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2.

5 El anticuerpo comprende adicionalmente una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos: F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G (SEC ID N°: 3) (que abarca aminoácidos desde la posición 50 a 65 de la HCVR consenso que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 7) y comprende adicionalmente una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos: (G/Y)-N-(D/S)-(Q/N)-R-P-S (SEC ID N°: 4) (que abarca aminoácidos de la posición 50 a 56 de la LCVR consenso que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 8).

10 El anticuerpo comprende adicionalmente una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos: F-T-F-S-(S/E)-Y-G-M-H (SEC ID N°: 5) (que abarca aminoácidos de la posición 27 a la 35 de la HCVR consenso que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 7) y comprende adicionalmente una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos: (S/T)-G-(G/S)-(R/S)-S-N-I-(G/V)-(S/A)-(N/G/Y)-(T/D)-V-(K/H) (SEC ID N°: 6) (que abarca aminoácidos de la posición 24 a 34 de la LCVR consenso que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 8).

El anticuerpo de la descripción comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8.

20 Pueden determinarse motivos consenso adicionales basándose en el análisis mutacional realizado en Y61 que condujo al anticuerpo J695 (resumido en las Figuras 2A-2H). Como se demuestra por las gráficas mostradas en las Figuras 2A-2H, ciertos restos de las CDR de cadena pesada y ligera de Y61 eran susceptibles de sustitución sin alterar significativamente las propiedades de unión de hIL-12 del anticuerpo. Por ejemplo, sustituciones individuales en la posición 30 en CDR H1 con doce restos de aminoácidos diferentes no redujeron significativamente la velocidad K_{off} del anticuerpo, lo que indica que su posición es susceptible de sustitución con una diversidad de restos de aminoácidos diferentes. Por lo tanto, basándose en el análisis mutacional (es decir, posiciones dentro de Y61 que eran susceptibles de sustitución por otros restos de aminoácidos) se determinaron motivos consenso. Los motivos consenso para las CDR3 de cadena pesada y ligera se muestran en SEC ID N°: 9 y 10, respectivamente, se muestran motivos consenso para las CDR2 de cadena pesada y ligera en SEC ID N°: 11 y 12, respectivamente, y se muestran motivos consenso para las CDR1 de cadena pesada y ligera en SEC ID N°: 13 y 14, respectivamente. Se muestran motivos consenso para las regiones VH y VL en SEC ID N°: 15 y 16, respectivamente.

En consecuencia, en un aspecto, la invención presenta un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características:

- a) inhibe la proliferación de blastos de fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos;
- b) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; y
- c) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende adicionalmente una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11 y comprende adicionalmente una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende adicionalmente una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13 y comprende adicionalmente una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14.

En otra realización preferida más, el anticuerpo de la invención comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 15 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16.

Un anticuerpo preferido de la invención, el anticuerpo humano anti hIL-12 Y61, se produjo por maduración de afinidad de Joe 9 de tipo silvestre por mutagénesis por PCR de la CDR3 (como se describe en el Ejemplo 1). Y61 tuvo una especificidad/afinidad de unión mejorada determinada por resonancia de plasmón superficial y por ensayos de neutralización *in vitro*. Las CDR3 de cadena pesada y ligera de Y61 se muestran en las SEC ID N°: 17 y 18, respectivamente, las CDR2 de cadena pesada y ligera de Y61 se muestran en SEC ID N°: 19 y 20, respectivamente, y las CDR1 de cadena pesada y ligera de Y61 se muestran en la SEC ID N°: 21 y 22, respectivamente. La VH de Y61 tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 23 y la VL de Y61 tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24 (estas secuencias también se muestran en las Figuras 1A-1D, alineadas con Joe9).

En consecuencia, en otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que

- a) inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos;
- b) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17; y

c) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18.

En una realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19 y una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20.

En otra realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22.

En otra realización preferida más, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 23, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa comprende una región constante de cadena pesada, tal como regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE, y cualquier variante alotípica de las mismas como se describe en Kabat (Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242). Preferiblemente, la región constante de cadena pesada de anticuerpo es una región constante de cadena pesada de IgG1. Como alternativa, la parte de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento Fv de cadena sencilla.

Las modificaciones de restos individuales de Y61 condujeron a la producción de un panel de anticuerpos mostrado en las Figuras 2A-2H. La especificidad/afinidad de unión de cada anticuerpo se determinó por resonancia de plasmón superficial y/o por ensayo de neutralización *in vitro*.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que

a) inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI₅₀ de 1×10^{-9} M o menos;

b) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 404-SEC ID N°: 469; y

c) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 534-SEC ID N°: 579.

En una realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 335-SEC ID N°: 403; y una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 506-SEC ID N°: 533.

En otra realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 288-SEC ID N°: 334; y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 470-SEC ID N°: 505.

En otra realización preferida más, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende la región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 23, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa que comprende una región constante de cadena pesada, tal como regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE, y cualquier variante alotípica de las mismas como se describe en Kabat (Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242). Preferiblemente, la región constante de cadena pesada de anticuerpo es una región constante de cadena pesada IgG1. Como alternativa, la parte de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento Fv de cadena sencilla.

Se produjo un anticuerpo neutralizante, recombinante particularmente preferido de la invención, J695, por mutagénesis dirigida restos de aminoácidos de hipermutación y de contacto de anticuerpo Y61 (véase Ejemplo 2 y sección III posteriormente). J695 difiere de Y61 por una sustitución de Gly a Tyr en Y61 en la posición 50 de la CDR2 de cadena ligera y por una sustitución de Gly a Tyr en la posición 94 de la CDR3 de cadena ligera. Las CDR3 de cadena pesada y ligera de J695 se muestran en SEC ID N°: 25 y 26, respectivamente, las CDR2 de cadena pesada y ligera de J695 se muestran en SEC ID N°: 27 y 28, respectivamente, y las CDR1 de cadena pesada y ligera de J695 se muestran en SEC ID N°: 29 y 30, respectivamente. La VH de J695 tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31 y la VL de J695 tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32 (estas secuencias también se muestran en las Figuras 1A-1D, alineadas con Joe9).

En consecuencia, en otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que

- a) inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos;
- b) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25; y
- c) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26.

En una realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27 y una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28.

En otra realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30.

En otra realización preferida más, el anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa comprende una región constante de cadena pesada, tal como regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE, y cualquier variante alotípica de las mismas como se describe en Kabat (Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242). Preferiblemente, la región constante de cadena pesada de anticuerpo es una región constante de cadena pesada de IgG1. Como alternativa, la parte de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento Fv de cadena sencilla.

Pueden realizarse mutaciones adicionales en las secuencias consenso preferidas para CDR3, CDR2 y CDR1 de anticuerpos en el linaje de Joe 9 a J695, o del linaje Y61 a J695, para proporcionar anticuerpos anti IL-12 adicionales de la invención. Tales métodos de modificación pueden realizarse usando técnicas de biología molecular convencionales, tales como por mutagénesis por PCR, dirección de restos de aminoácidos de hipermutación o contacto individual en las CDR de cadena ligera y/o cadena pesada, seguido de análisis cinético y funcional de los anticuerpos modificados como se describen en este documento (por ejemplo, ensayos de neutralización descritos en el Ejemplo 3, y por análisis de BIAcore, como se describe en el Ejemplo 5).

En consecuencia, la descripción proporciona un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que

- a) inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-6} M o menos;
- b) comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 y una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, o un mutante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de mutagénesis selectiva preferida o una posición de hipermutación, en la que dicho mutante tiene una velocidad k_{off} no más de 10 veces mayor que el anticuerpo que comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, y una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5; y
- c) comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, o un mutante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de mutagénesis selectiva preferida o una posición de hipermutación, en la que dicho mutante tiene una velocidad k_{off} no más de 10 veces mayor que el anticuerpo que comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6.

En otro aspecto la invención presenta un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que

- a) inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos;
- b) comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11 y una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13, o un mutante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición

de contacto o una posición de hipermutación, en las que dicho mutante tiene una velocidad k_{off} no más de 10 veces mayor que el anticuerpo que comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11, y una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13;

y

c) comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14, o un mutante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o una posición de hipermutación, en las que dicho mutante tiene una velocidad k_{off} no más de 10 veces mayor que el anticuerpo que comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14.

Un experto habitual en la materia también apreciará que pueden realizarse mutaciones adicionales a las regiones CDR de un anticuerpo de la invención, por ejemplo en Y 61 o en J 695, para proporcionar anticuerpos anti IL-12 adicionales de la invención. Tales métodos de modificación pueden realizarse usando técnicas de biología molecular convencionales, como se ha descrito anteriormente. El análisis funcional y cinético de los anticuerpos modificados puede realizarse como se describe en el Ejemplo 3 y Ejemplo 5, respectivamente. Se muestran modificaciones de restos individuales de Y 61 que condujeron a la identificación de J 695 en las Figuras 2A-2H y se describen en el Ejemplo 2.

En consecuencia, en otro aspecto la invención presenta un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que

a) inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos;

b) comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19 y una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21, o un mutante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de mutagénesis selectiva preferida o una posición de hipermutación, en las que dicho mutante tiene una velocidad k_{off} no más de 10 veces mayor que el anticuerpo que comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19, y una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21; y

c) comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22, o un mutante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de mutagénesis selectiva preferida o una posición de hipermutación, en las que dicho mutante tiene una tasa k_{off} no más de 10 veces mayor que el anticuerpo que comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 18, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22.

En otro aspecto la invención presenta un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que

a) inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos;

b) comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27 y una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29, o un mutante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de mutagénesis selectiva preferida o una posición de hipermutación, en la que dicho mutante tiene una tasa k_{off} no más de 10 veces mayor que el anticuerpo que comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27, y una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29; y

c) comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28 y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30, o un mutante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en una posición de mutagénesis selectiva preferida o una posición de hipermutación, en la que dicho mutante tiene una velocidad k_{off} no más de 10 veces mayor que el anticuerpo que comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28, y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30.

En otra realización más, la invención proporciona anticuerpos humanos aislados, o partes de unión a antígeno de los mismos, que neutralizan la actividad de IL-12 humana, y al menos una IL-12 de primate adicional seleccionada del grupo que consiste en IL-12 de babuino, IL-12 de tití, IL-12 de chimpancé, IL-12 de cynomolgus e IL-12 de rhesus, pero que no neutralizan la actividad de la IL-12 de ratón.

5

II Selección de anticuerpos humanos recombinantes

Pueden aislarse anticuerpos humanos de la invención explorando una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante, preferiblemente una biblioteca de presentación de fagos de scFv, preparada usando ADNc de VL y VH humanos preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Se conocen en la técnica metodologías para preparar y explorar tales bibliotecas. Además de kits disponibles en el mercado para generar bibliotecas de presentación de fagos (por ejemplo, el *Sistema de Anticuerpo de Fago Recombinante* de Pharmacia nº de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación de fagos de Stratagene *SurfZAP™*, nº de catálogo 240612), pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles de uso en generación y exploración de bibliotecas de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, Kang *et al.* Publicación de PCT Nº WO 92/18 619; Winter *et al.* Publicación de PCT Nº WO 92/2 0791; Breitling *et al.* Publicación de PCT Nº WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación de PCT Nº WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación de PCT Nº WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3: 81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348: 552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226: 889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89: 3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *BiolTechnology* 9: 1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19: 4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88: 7978-7982.

Las bibliotecas de anticuerpo usadas en este método son preferiblemente bibliotecas de scFv preparadas a partir de ADNc de VL y VH humanas. Las bibliotecas de anticuerpos scFv se exploran preferiblemente usando IL-12 humana recombinante como el antígeno para seleccionar secuencias de cadena pesada y ligera humanas que tienen una actividad de unión a IL-12. Para seleccionar anticuerpos específicos para la subunidad p35 de IL-12 o el heterodímero p70, se realizaron ensayos de exploración en presencia de exceso de subunidad p40 libre. Las preferencias de subunidad pueden determinarse, por ejemplo, mediante titulación micro-Friguet, como se describe en el Ejemplo 1.

Una vez que se seleccionan segmentos VL y VH humanos iniciales, se realizan experimentos de "mezcla y emparejamiento", en los que se exploran diferentes pares de los segmentos VL y VH seleccionados con respecto a unión de IL-12, para seleccionar combinaciones de pares VL/VH preferidos (véase Ejemplo 1). Adicionalmente, para mejorar más la afinidad y/o reducir la constante de velocidad de disociación para unión de hIL-12, los segmentos VL y VH de los pares de VL/VH preferidos pueden mutarse de forma aleatoria, preferiblemente dentro de la región CDR3 de VH y/o VL, en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de maduración de afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración de afinidad *in vitro* puede conseguirse amplificando regiones VH y VL usando cebadores de PCR complementarios de la CDR3 de VH o CDR3 de VL, respectivamente, habiéndose "realizado adiciones" a los cebadores con una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones de modo que los productos de PCR resultantes codifican segmentos VH y VL en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones de CDR3 VH y/o VL. Estos segmentos VH y VL mutados de forma aleatoria pueden volver a seleccionarse y volver a explorarse con respecto a unión con hIL-12 y pueden seleccionarse secuencias que muestran alta afinidad y una velocidad de disociación baja para unión de IL-12. La Tabla 2 (véase Apéndice A) muestra anticuerpos que presentan especificidad/afinidad de unión alterada producida como resultado de maduración de afinidad *in vitro*.

Después de selección, aislamiento y exploración de un anticuerpo anti-hIL-12 de la invención a partir de una biblioteca de presentación de inmunoglobulina recombinante, puede recuperarse el ácido nucleico que codifica el anticuerpo seleccionado de la partícula o las partículas de fago (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Si se desea, el ácido nucleico puede manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo de la invención (por ejemplo, unirse a ácido nucleico que codifica dominios de inmunoglobulina adicionales, tales como regiones constantes adicionales). Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado explorando una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula hospedadora de mamífero, como se describe en más detalle en la Sección IV posteriormente.

Se describen en más detalle métodos para seleccionar anticuerpos de unión a IL-12 humana mediante tecnología de presentación de fagos, y maduración de afinidad de anticuerpos seleccionados por mutagénesis aleatoria o dirigida de regiones CDR en el Ejemplo 1.

Como se describe en el Ejemplo 1, la exploración de bibliotecas de ADNc de VL y VH humanas identificó una serie de anticuerpos anti-IL-12, de los que el anticuerpo Joe 9 se seleccionó para desarrollo adicional. Una comparación de la región variable de cadena pesada de Joe 9 con las secuencias de línea germinal de cadena pesada seleccionadas de la base de datos VBASE, reveló que Joe 9 era similar a la secuencia de línea germinal de COS-3. COS-3 pertenece a la familia V_H3 de secuencias de línea germinal.

La familia V_{H3} es parte del repertorio de línea germinal de VH humana que se agrupa en siete familias, V_{N1}-V_{H7}, basándose en homología de secuencias de nucleótidos (Tomlinson *et al.* (1992) J. Mol. Biol., 227, 776-798 y Cook *et al.* (1995) Immunology Today, 16, 237-242). La familia V_{H3} contiene el mayor número de miembros y realiza la mayor contribución al repertorio de línea germinal. Para cualquier secuencia de anticuerpo de línea germinal de V_{H3} humana dada, la identidad de secuencia de aminoácidos dentro de la familia V_{H3} completa es alta (Véase por ejemplo, Tomlinson *et al.* (1992) J. Mol. Biol., 227, 776-798 y Cook *et al.* (1995) Immunology Today, 16, 237-242). El intervalo de identidad de secuencias de aminoácidos entre dos secuencias VH de línea germinal cualesquiera de la familia V_{H3} varía de 69 a 98 restos de aproximadamente 100 restos de VH (es decir, 69-98% de homología de secuencia de aminoácidos entre dos secuencias VH de línea germinal cualesquiera). Para la mayoría de los pares de secuencias de línea germinal hay al menos 80 o más restos de aminoácidos idénticos, (es decir, al menos 80% de homología de secuencias de aminoácidos). El alto grado de homología de secuencia de aminoácidos entre los miembros de la familia V_{H3} da como resultado que ciertos restos de aminoácidos estén presentes en sitios clave en las regiones CDR y marco de la cadena de VH. Estos restos de aminoácidos confieren características estructurales a las CDR.

Estudios de estructuras de anticuerpos han mostrado que las conformaciones de CDR pueden agruparse en familias de estructuras de CDR canónicas basándose en los restos de aminoácidos clave que ocupan ciertas posiciones en las regiones que ocupa ciertas posiciones en las regiones CDR y marco. En consecuencia, existen conformaciones de CDR locales similares en diferentes anticuerpos que tienen estructuras canónicas con restos de aminoácidos clave idénticos (Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol., 196, 901-917 y Chothia *et al.* (1989) Nature, 342, 877-883). Dentro de la familia V_{H3} hay una conservación de identidad de restos de aminoácidos en los sitios clave para las estructuras canónicas CDR1 y CDR2 (Chothia *et al.* (1992) J. Mol. Biol., 227, 799-817).

El gen de VH de línea germinal de COS-3, es un miembro de la familia V_{H3} y es una variante del alelo de VH de línea germinal 3-30 (DP-49). COS-3, difiere de las secuencias de aminoácidos de VH Joe9 en solamente 5 posiciones. El alto grado de homología de secuencia de aminoácidos entre VH Joe9 y COS-3, y entre VH Joe9 y los otros miembros de la familia de V_{H3} también confiere un alto grado de homología estructural de CDR (Chothia *et al.* (1992) J. Mol. Biol., 227, 799-817; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol., 196, 901-917 y Chothia *et al.* (1989) Nature, 342, 877-883).

El experto en la materia apreciará que basándose en la alta similitud de secuencia de aminoácidos y de estructura canónica con Joe9, otros miembros de la familia V_{H3} también podrían usarse para generar anticuerpos que se unen a IL-12 humana. Esto puede realizarse, por ejemplo, seleccionando una VL apropiada por técnicas de redistribución de cadenas (Winter *et al.* (1994) Annual Rev. Immunol., 12, 433-55), o mediante el injerto de CDR de un roedor u otro anticuerpo humano incluyendo CDR de anticuerpos de la presente invención en un armazón de familia V_{H3}.

El repertorio de línea germinal de V_λ humano se agrupa en 10 familias basándose en homología de secuencia de nucleótidos (Williams *et al.* (1996) J. Mol. Biol., 264, 220-232). Una comparación de la región variable de cadena ligera de Joe9 con las secuencias de línea germinal de cadena ligera seleccionadas de la base de datos VBASE, reveló que Joe9 era similar a la línea germinal de DPL8_λ. La VL Joe9 difiere de la secuencia de DPL8 en solamente cuatro posiciones flanqueantes, y es altamente homóloga de las secuencias marco conservadas de los otros miembros de la familia V_{λ1}. Basándose en la alta homología de secuencia de aminoácidos y similitud de estructura canónica con Joe9, también pueden usarse otros miembros de la familia V_{λ1} para generar anticuerpos que se unen a IL-12 humana. Esto puede realizarse, por ejemplo, seleccionando una VH apropiada por técnicas de redistribución de cadena (Winter *et al.* mencionado anteriormente, o mediante el injerto de CDR de un roedor u otro anticuerpo humano incluyendo CDR de anticuerpos de la presente invención en un armazón de familia V_{λ1}).

Se pretende que los métodos de la invención incluyan anticuerpos recombinantes que se unen a hIL-12, que comprende una región variable de cadena pesada derivada de un miembro de la familia V_{H3} de secuencias de línea germinal, y una región variable de cadena ligera derivada de un miembro de la familia V_{λ1} de las secuencias de línea germinal. Además, el experto en la materia apreciará que cualquier miembro de la secuencia de cadena pesada de la familia V_{H3} puede combinarse con cualquier miembro de la secuencia de cadena ligera de la familia V_{λ1}.

Los expertos en la materia también apreciarán que pueden existir polimorfismos de secuencia de ADN que conduzcan a cambios en las secuencias de aminoácidos de la línea germinal dentro de una población (por ejemplo, la población humana). Tal polimorfismo genético en las secuencias de línea germinal puede existir entre individuos dentro de una población debido a variación alélica natural. Tales variaciones alélicas naturales pueden dar como resultado típicamente varianza de 1-5% en las secuencias de nucleótidos del gen. Se pretende que todas y cada una de tales variaciones de nucleótidos y polinucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes en secuencias de línea germinal que son el resultado de variación alélica natural estén dentro del alcance de la invención.

En consecuencia, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características:

a) que se une a IL-12 humana y se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad K_{off} de $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos, como se determina por resonancia de plasmón superficial, o que inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de proliferación de blastos de fitohemaglutinina *in vitro* (ensayo de PHA) con una CI_{50} de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ o menos.

b) tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un miembro de la familia de línea germinal V_{H3} , en la que la región variable de cadena pesada tiene una mutación en un contacto o posición de hipermutación con un resto de aminoácido potenciador de actividad.

c) tiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un miembro de la familia de línea germinal $V_{\lambda 1}$, en la que la región variable de cadena ligera tiene una mutación en una posición de mutagénesis selectiva preferida, contacto o posición de hipermutación con un resto de aminoácido potenciador de actividad.

En una realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o unión a antígeno, tiene mutación en la CDR3 de cadena pesada.

En otra realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o unión a antígeno, tiene mutación en la CDR3 de cadena ligera.

En otra realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o unión a antígeno, tiene mutación en la CDR2 de cadena pesada.

En otra realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o unión a antígeno, tiene mutación en la CDR2 de cadena ligera.

En otra realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o unión a antígeno, tiene mutación en la CDR1 de cadena pesada.

En otra realización preferida, el anticuerpo humano aislado, o unión a antígeno, tiene mutación en la CDR1 de cadena ligera.

Un experto habitual en la materia apreciará que basándose en la alta similitud de secuencia de aminoácidos entre los miembros de la familia de línea germinal V_{H3} , o entre miembros de la familia de línea germinal $V_{\lambda 1}$ de cadena ligera, que las mutaciones de las secuencias de línea germinal pueden proporcionar anticuerpos adicionales que se unen a IL-12 humana. La Tabla 1 (véase Apéndice A) muestra las secuencias de línea germinal de los miembros de la familia V_{H3} y demuestra la homología de secuencia significativa dentro de los miembros de la familia. También se muestran en la Tabla 1 las secuencias de línea germinal para miembros de la familia $V_{\lambda 1}$. Las secuencias de cadena pesada y ligera de Joe 9 se proporcionan como una comparación. Pueden realizarse mutaciones de las secuencias de línea germinal de miembros de la familia V_{H3} o $V_{\lambda 1}$, por ejemplo, en las mismas posiciones de aminoácidos que las realizadas en los anticuerpos de la invención (por ejemplo mutaciones en Joe 9). Las modificaciones pueden realizarse usando técnicas de biología molecular convencionales, tales como por mutagénesis por PCR, dirección de restos de aminoácidos individuales a las secuencias de línea germinal, seguido de análisis cinético y funcional de los anticuerpos modificados como se describen en este documento (por ejemplo, ensayos de neutralización descritos en el Ejemplo 3 y por análisis de BIAcore, como se describe en el Ejemplo 5).

En consecuencia, en un aspecto, la invención presenta anticuerpo humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características:

a) tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 595-667, en la que la región variable de cadena pesada tiene una mutación en una posición de mutagénesis selectiva preferida, contacto o posición de hipermutación con un resto de aminoácido potenciador de actividad.

b) tiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 669-675, en la que la región variable de cadena ligera tiene una mutación en una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación con un resto de aminoácido potenciador de actividad.

Un experto habitual en la materia apreciará que basándose en la alta similitud de secuencia de aminoácidos entre secuencia de línea germinal de cadena pesada Joe 9 y COS-3, y entre secuencia de línea germinal λ Joe 9 y DPL8, que otras mutaciones a las regiones CDR de estas secuencias de línea germinal pueden proporcionar anticuerpos adicionales que se unen a IL-12 humana. Tales métodos de modificación pueden realizarse usando técnicas de biología molecular convencionales como se han descrito anteriormente.

En consecuencia, en un aspecto, la descripción proporciona anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características:

a) que se une a IL-12 humana y se disocia de IL-12 humana con una velocidad K_{off} constante de $0,1 \text{ s}^{-1}$ o

menos, como se determina por resonancia de plasmón superficial, o que inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de proliferación de blastos por fitohemaglutinina *in vitro* (ensayo PHA) con una CI_{50} de 1×10^{-6} M o menos.

b) tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de línea germinal COS-3, en la que la región variable de cadena pesada tiene una mutación en una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación con un resto de aminoácido potenciador de actividad.

c) tiene una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de línea germinal DPL8, en la que la región variable de cadena ligera tiene una mutación en una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación con un resto de aminoácido potenciador de actividad.

Debido a que ciertos restos de aminoácidos ocupan sitios clave en las regiones CDR y marco en la región variable de cadena ligera y pesada, se confieren características estructurales en estas regiones. En particular, las regiones CDR2 y CDR1 se someten a clasificaciones estructurales canónicas. Puesto que hay un alto grado de homología de secuencia de aminoácidos entre miembros de la familia, estas características canónicas están presentes entre miembros de la familia. El experto en la materia apreciará que modificaciones en los restos de aminoácidos que confieren estas estructuras canónicas producirían anticuerpos adicionales que se unen a IL-12. Las modificaciones pueden realizarse usando técnicas de biología molecular convencionales como se ha descrito anteriormente.

En consecuencia, en otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo humano aislado o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características:

a) que se une a IL-12 humana y se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad K_{off} de $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos, como se determina por resonancia de plasmón superficial, o que inhibe proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de proliferación de blastos por fitohemaglutinina *in vitro* (ensayo PHA) con una CI_{50} de 1×10^{-6} M o menos.

b) tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un miembro de la familia de línea germinal V_{H3} , en la que la región variable de cadena pesada comprende una CDR2 que es estructuralmente similar a CDR2 de otros miembros de la familia de línea germinal V_{H3} , y una CDR1 que es estructuralmente similar a CDR1 de otros miembros de la familia de línea germinal V_{H3} , y en la que la región variable de cadena pesada tiene una mutación en una posición de mutagénesis selectiva preferida, contacto o posición de hipermutación con un resto de aminoácido potenciador de actividad.

c) tiene una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un miembro de la familia de línea germinal V_{L1} , en la que la región variable de cadena ligera comprende una CDR2 que es estructuralmente similar a CDR2 de otros miembros de la familia de línea germinal V_{L1} , y una CDR1 que es estructuralmente similar a CDR1 de otros miembros de la familia de línea germinal V_{L1} , y en la que la región variable de cadena ligera tiene una mutación en una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación con un resto de aminoácido potenciador de actividad.

Los anticuerpos humanos recombinantes de la invención tienen regiones variables y constantes que son homólogas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas seleccionadas de la base de datos VBASE. Las mutaciones de los anticuerpos humanos recombinantes (por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mutagénesis por PCR) dan como resultado aminoácidos que no se codifican por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, bibliotecas de anticuerpos recombinantes que derivaron de donantes humanos contendrán secuencias de anticuerpo que difieren de sus secuencias de línea germinal correspondientes debido al proceso normal de mutación somática que se produce durante el desarrollo de linfocitos B. Debería observarse que si las secuencias de "línea germinal" obtenidas por amplificación por PCR codifican diferencias de aminoácidos en las regiones marco de la verdadera configuración de línea germinal (es decir, diferencias en la secuencia amplificada en comparación con la verdadera secuencia de línea germinal), puede ser deseable cambiar estas diferencias de aminoácidos de vuelta a las verdaderas secuencias de línea germinal (es decir "retromutación" de restos flanqueantes a la configuración de línea germinal). Por lo tanto, la presente invención puede incluir opcionalmente una etapa de retromutación. Para hacer esto, las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera codificadas por la línea germinal (como se encuentran por ejemplo en la base de datos VBASE) se comparan en primer lugar con las secuencias de aminoácidos marco de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina mutada para identificar restos de aminoácidos en la secuencia marco de inmunoglobulina mutada que difieren de las secuencias de línea germinal más cercanas. Después, los nucleótidos apropiados de la secuencia de inmunoglobulina mutada se mutan de nuevo para corresponder a la secuencia de línea germinal, usando el código genético para determinar qué cambios de nucleótidos deberían realizarse. La mutagénesis de la secuencia marco de inmunoglobulina mutada se lleva a cabo por métodos convencionales, tales como mutagénesis mediada por PCR (en la que los nucleótidos mutados se incorporan en los cebadores de PCR de modo que el producto de PCR contenga las mutaciones) o mutagénesis dirigida. El papel de cada aminoácido identificado como candidato para retromutación debería investigarse con respecto a un papel directo o indirecto en unión de antígenos y cualquier aminoácido que se descubra después de la mutación que afecta a cualquiera característica deseable del anticuerpo humano no debería incluirse en el anticuerpo humano final; como ejemplo, los aminoácidos potenciadores de actividad identificados por enfoque de mutagénesis selectiva no se someterán a retromutación. Los ensayos para determinar las características del anticuerpo resultante de mutagénesis pueden incluir ELISA, ELISA competitiva, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo* y/o (véase por ejemplo el Ejemplo 3) inmunohistoquímica con secciones tisulares de diversas fuentes

(incluyendo humana, primate y/u otras especies).

Para minimizar el número de aminoácidos que se someten a retromutación las posiciones de aminoácidos que se descubre que son diferentes de la secuencia de línea germinal más cercana pero idénticas a los aminoácidos correspondientes en una segunda secuencia de línea germinal pueden permanecer, siempre que la segunda secuencia de línea germinal sea idéntica y colineal a la secuencia del anticuerpo humano de la invención para al menos 10, preferiblemente 12 aminoácidos, en ambos lados de los aminoácidos en cuestión. Esto aseguraría que cualquier epítipo peptídico presentado al sistema inmune por células presentadoras de antígenos profesionales en un sujeto tratado con el anticuerpo humano de la invención no sería ajeno sino idéntico a un autoantígeno, es decir la inmunoglobulina codificada por esa segunda secuencia de línea germinal. La retromutación puede producirse en cualquier etapa de optimización de anticuerpos; preferiblemente, la retromutación se produce directamente antes o después del enfoque de mutagénesis selectiva. Más preferiblemente, la retromutación se produce directamente antes del enfoque de mutagénesis selectiva.

III. Modificaciones de posiciones de mutagénesis selectiva preferidas, posiciones de contacto y/o hipermutación

Típicamente, puede llevarse a cabo selección de anticuerpos con afinidades mejoradas usando métodos de presentación de fagos, como se ha descrito en la sección II anterior. Esto puede conseguirse mutando de forma aleatoria combinaciones de restos de CDR y generando bibliotecas grandes que contengan anticuerpos de diferentes secuencias. Sin embargo, para que estos métodos de selección funcionen, la reacción anticuerpo-antígeno debe tender al equilibrio para permitir, a lo largo del tiempo, unión preferente de anticuerpos de mayor afinidad con el antígeno. Las condiciones de selección que permitirían que se estableciera equilibrio no pudieron determinarse (supuestamente debido a interacciones no específicas adicionales entre el antígeno y la partícula de fago) cuando se usaron métodos de presentación de fagos para mejorar la afinidad de anticuerpos anti IL-12 seleccionados, tras obtener un cierto nivel de afinidad consensuada (es decir, la del anticuerpo Y61). En consecuencia, los anticuerpos con afinidades aún mayores no pudieron seleccionarse por métodos de presentación de fagos. Por lo tanto, para al menos ciertos anticuerpos o antígenos, los métodos de presentación de fagos son limitantes en su capacidad para seleccionar anticuerpos con una especificidad/afinidad de unión altamente mejorada. En consecuencia, se estableció un método denominado Enfoque de Mutagénesis Selectiva que no requiere maduración de afinidad de presentación de fagos de anticuerpos, para superar esta limitación y se proporciona por la invención. Aunque este enfoque de mutagénesis selectiva se desarrolló para superar limitaciones usando el sistema de presentación de fagos, debería observarse que este método también puede usarse con el sistema de presentación de fagos. Además, el enfoque de mutagénesis selectiva puede usarse para mejorar la actividad de cualquier anticuerpo.

Para mejorar la actividad (por ejemplo, afinidad o actividad neutralizadora) de un anticuerpo, idealmente se mutaría cada posición de CDR en las cadenas tanto pesadas como ligeras a cada otro resto de aminoácido posible. Sin embargo, puesto que hay, de media, 70 posiciones de CDR dentro de un anticuerpo, un enfoque tal consumiría mucho tiempo y requeriría mucho trabajo. En consecuencia, el método de la invención permite mejorar la actividad del anticuerpo mutando solamente ciertos restos seleccionados dentro de las CDR de cadena pesada y/o ligera. Además, el método de la invención permite mejorar la actividad del anticuerpo sin afectar a otras propiedades deseables del anticuerpo.

La determinación de qué restos de aminoácidos de una región variable de anticuerpo están en contacto con un antígeno no puede predecirse de forma precisa basándose en secuencia primaria o sus posiciones dentro de la región variable. Sin embargo, alineamientos de secuencias de anticuerpos con diferentes especificidades realizadas por Kabat *et al.* han identificado las CDR como regiones locales dentro de las regiones variables que difieren significativamente entre anticuerpos (Kabat *et al.* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-393, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242). Estudios estructurales han mostrado que la superficie de unión a antígeno se forma por restos de aminoácidos presentes en las CDR. También se sabe que otros restos de aminoácidos fuera de las CDR desempeñan papeles estructurales o están implicados directamente en unión de antígenos. Por lo tanto, para cada par de antígeno-anticuerpo, pueden ser importantes restos de aminoácidos dentro y fuera de las CDR.

Los estudios de alineamiento de secuencias por Tomlison *et al.* identificaron varias posiciones en la CDR1 y CDR2 de cadena pesada y ligera, y en una parte de la CDR3 de cadena kappa que son sitios frecuentes de mutación somática (Tomlison *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 256: 813-817). En particular, se identificaron las posiciones H31, H31B, H33, H33B, H52B, H56, H58, L30, L31, L31A, L50, L53, L91, L92, L93 y L94 como sitios frecuentes de mutación somática. Sin embargo, este análisis excluye las importantes regiones CDR3 de cadena pesada, y secciones de la CDR3 de cadena ligera que se sabe que quedan en el centro de un sitio de unión a anticuerpos, y potencialmente proporcionan interacciones importantes con un antígeno. Además, Tomlison *et al.* proponen que la diversidad somática por sí sola no predice necesariamente un papel de un aminoácido específico en unión de antígenos, y sugieren restos de aminoácidos conservados que entran en contacto con el antígeno, y diversos restos de aminoácidos que no entran en contacto con el antígeno. Esta conclusión se apoya adicionalmente por estudios mutacionales sobre el papel de mutaciones somáticas a la afinidad de anticuerpos (Sharon, (1990), PNAS, 87: 4814-7). Se reemplazaron simultáneamente diecinueve mutaciones somáticas en un anticuerpo anti-p-azofenilarsonato

(Ars) de alta afinidad con sus restos de línea germinal correspondientes, generando una versión de línea germinal del anticuerpo anti Ars que tenía una pérdida de docientos veces de la actividad. La afinidad completa del anticuerpo anti Ars pudo recuperarse restaurando solamente tres de las diecinueve mutaciones somáticas, demostrando que puede permitirse muchas mutaciones somáticas que no contribuyen a la actividad de unión a antígenos.

El resultado puede explicarse en parte por la naturaleza de la diversidad de anticuerpos en sí misma. Los linfocitos B inmaduros pueden producir inicialmente anticuerpos de baja afinidad que reconocen varios antígenos propios o no. Además, los anticuerpos pueden experimentar en el transcurso de maduración de afinidad variaciones de secuencia que pueden provocar autorreactividad. La hipermutación de tales anticuerpos de baja afinidad puede servir para suprimir autorreactividad ("selección negativa") y aumentar la afinidad por el antígeno ajeno. Por lo tanto, el análisis de datos primarios y estructurales de un gran número de anticuerpos no proporciona un método para predecir (1) el papel de sitios de hipermutación somática en el proceso de maduración de afinidad frente al proceso de reducción de afinidad para antígenos no deseados, o (2) como contribuye un aminoácido dado a las propiedades de un par de antígeno-anticuerpo específico.

Otros intentos para abordar el papel de restos de aminoácidos específicos en reconocimiento de antígenos se realizaron analizando varias estructuras cristalinas de complejos antígeno-anticuerpo (MacCallum *et al.* (1996) J. Mol. Biol. 26 2: 732-745). Se indicó el papel potencial de posiciones localizadas dentro y fuera de las CDR. Las posiciones en CDR implicadas en un ión de antígenos en más de 10 de 26 estructuras analizadas incluyeron H31, H33, H50, H52, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98 y H100 en la cadena pesada y L30A, L32, L91, L92, L93, L94, L96 en la cadena ligera. Sin embargo, los autores observaron que la predicción de contactos de antígeno no usando estos y otros datos estructurales puede sobre e infrapredicir posiciones de contacto, lo que conduce a la especulación de que puede tener que aplicarse una estrategia diferente a diferentes antígenos.

Pini *et al.* describen selección aleatoria de múltiples restos en secuencias de CDR de anticuerpo en una biblioteca de presentación de fagos grande para aumentar rápidamente la afinidad de anticuerpos (Pini *et al.* (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776). Sin embargo, los anticuerpos de alta afinidad analizados por Pini *et al.* tuvieron mutaciones en un total de ocho posiciones, y un análisis reductivo de qué cambios se requieren de forma absoluta para mejorar la afinidad del anticuerpo se hace poco práctico debido al gran número de posibles combinaciones para ensayar para el número más pequeño de aminoácidos requerido.

Además, la selección aleatoria de múltiples restos puede no conservar necesariamente otras propiedades deseadas del anticuerpo. Las propiedades o características deseables de un anticuerpo se reconocen en la técnica e incluyen por ejemplo, conservación de reactividad no cruzada, por ejemplo, con otras proteínas o tejidos humanos y conservación de secuencias de anticuerpo que están cerca de la mejora de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana de potencia de neutralización. Otras propiedades o características deseables incluyen la capacidad de conservar reactividad cruzada de especies, capacidad para conservar especificidad de epítopos y capacidad para conservar altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero. Las propiedades o características deseables pueden observarse o medirse usando técnicas reconocidas en la materia incluyendo pero sin limitación ELISA, ELISA competitivo, ensayo de neutralización *in vitro* e *in vivo* (véase por ejemplo, Ejemplo 3), inmunohistoquímica con secciones tisulares de diferentes fuentes incluyendo fuentes humanas, de primate u otras según se requiera, y estudios para expresión en células de mamífero usando expresión transitoria o expresión estable.

Además, el método de Pini *et al.* puede introducir más cambios que el número mínimo requerido de hecho para mejorar la afinidad y puede conducir a que los anticuerpos desencadenen formación de anticuerpo anti humano (HAMA) en sujetos humanos. Además, como se analiza en otro lugar, la presentación de fagos como se demuestra aquí, u otro método relacionado incluyendo presentación de ribosomas puede no actuar de forma apropiada tras alcanzar ciertas afinidades entre anticuerpo y antígeno y las condiciones requeridas para alcanzar el equilibrio pueden no establecerse en un marco de tiempo razonable debido a interacciones adicionales incluyendo interacciones con otros componentes de fagos o ribosomas y el antígeno.

El experto habitual en la materia puede encontrar información científica interesante sobre el origen de la diversidad de anticuerpos a partir de las enseñanzas de las referencias analizadas anteriormente. La presente invención, sin embargo, proporciona un método para aumentar la afinidad de anticuerpo de un par de antígeno-anticuerpo específico conservando a la vez otros elementos relevantes o características deseables del anticuerpo. Esto es especialmente importante cuando se considera la conveniencia de transmitir una multitud de características diferentes en un anticuerpo específico incluyendo unión de antígenos.

Si el anticuerpo de partida tiene propiedades o características deseables que necesitan conservarse, un enfoque de mutagénesis selectiva puede ser la mejor estrategia para conservar estas propiedades deseables mejorando a la vez la actividad del anticuerpo. Por ejemplo, en la mutagénesis de Y61, el objetivo era aumentar la afinidad por hIL-12, y mejorar la potencia de neutralización de anticuerpo conservando a la vez propiedades deseadas. Las propiedades deseadas de Y61 incluían (1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, (2) conservación de especificidad de epítopos fina, es decir reconocer un epítopo p 40

preferiblemente en el conteo del heterodímero p70 (p40/p35), evitando de este modo la interferencia de unión de p40 soluble libre; y (3) generación de un anticuerpo con secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera que estaban tan cerca como fuera posible de sus secuencias de inmunoglobulina de línea germinal respectivas.

En una realización, el método de la invención proporciona un enfoque de mutagénesis selectiva como una estrategia para conservar las propiedades o características deseables del anticuerpo mejorando a la vez la afinidad y/o potencia de neutralización. La expresión “enfoque de mutagénesis selectiva” es como se ha definido anteriormente e incluye un método para mutar individualmente restos de aminoácidos seleccionados. Los restos de aminoácidos para mutar pueden primero seleccionarse de posiciones de mutagénesis selectivas preferidas, después de posiciones de contacto, y después de posiciones de hipermutación. La posición seleccionada individual puede mutarse a al menos otros dos restos de aminoácidos y se determina el efecto de la mutación tanto en las propiedades deseadas del anticuerpo como en la mejora de la actividad del anticuerpo.

El enfoque de Mutagénesis Selectiva comprende las etapas de:

seleccionar posiciones candidatas en el orden 1) posiciones de mutagénesis selectiva preferidas; 2) posiciones de contacto; 3) posiciones de hipermutación y clasificar las posiciones basándose en la localización de la posición dentro de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo (CDR 3 preferida frente a CDR2 preferida frente a CDR1);

mutar individualmente posiciones de mutagénesis selectiva preferidas candidatas, posiciones de hipermutación y/o contacto en el orden de clasificación, a todos los otros restos de aminoácidos posibles y analizar el efecto de las mutaciones individuales en la actividad del anticuerpo para determinar los restos de aminoácidos potenciadores de actividad;

si es necesario, realizar combinaciones por etapas de los restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales y analizar el efecto de las diversas combinaciones sobre la actividad de los anticuerpos; seleccionar anticuerpos mutantes con restos de aminoácidos potenciadores de actividad y clasificar los anticuerpos mutantes basándose en la localización e identidad de las sustituciones de aminoácidos con respecto a su potencial inmunogénico. Se proporciona la clasificación más alta a anticuerpos mutantes que comprenden una secuencia de aminoácidos que es casi idéntica a una secuencia de región variable que se describe en una base de datos de línea germinal, o tiene una secuencia de aminoácidos que es comparable a otros anticuerpos humanos. Se proporciona clasificación inferior a anticuerpos mutantes que contienen una sustitución de aminoácidos que se encuentra pocas veces en secuencias de línea germinal o las secuencias de otros anticuerpos humanos. La clasificación más baja se da a anticuerpos mutantes con una sustitución de aminoácidos que no se ha encontrado en una secuencia de línea germinal o la secuencia de otro anticuerpo humano. Como se ha expuesto anteriormente, los anticuerpos mutantes que comprenden al menos un resto de aminoácido potenciador de actividad localizado en CDR3 se prefieren frente a CDR2 que se prefiere frente a CDR1. Las CDR de las regiones variables de cadena pesada se prefieren frente a las de la región variable de cadena ligera.

Los anticuerpos mutantes pueden también estudiarse con respecto a mejora de la actividad, por ejemplo cuando se comparan con su anticuerpo parental correspondiente. La mejora de la actividad del anticuerpo mutante puede determinarse, por ejemplo, por ensayos de neutralización, o especificidad/afinidad de unión por análisis de resonancia de plasmón superficial (véase Ejemplo 3). Preferiblemente, la mejora de la actividad puede ser al menos 2-20 veces mayor que el anticuerpo parental. La mejora de actividad puede ser al menos “x₁” a “x₂” veces mayor que el anticuerpo parental en la que “x₁” y “x₂” son números enteros entre e incluyendo de 2 a 20, incluyendo intervalos dentro del intervalo indicado, por ejemplo 2-15, por ejemplo 5-10.

Los anticuerpos mutantes con los restos de aminoácidos potenciadores de actividad también pueden estudiarse para determinar si al menos una propiedad deseable se ha conservado después de la mutación. Por ejemplo, ensayando anticuerpos anti-hIL-12 con respecto a (1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, (2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocimiento de un epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 (p40/p35), evitando de este modo interferencia de unión de p40 soluble libre; y (3) generación de anticuerpos con secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera que estaban tan cerca como fuera posible de sus secuencias de inmunoglobulina de línea germinal respectivas, y determinando cual sería menos probable que indujera una respuesta inmune humana basándose en el número de diferencias de la secuencia germinal. Las mismas observaciones pueden realizarse sobre un anticuerpo que tenga más de un resto de aminoácido potenciado para actividad, por ejemplo al menos dos o al menos tres restos de aminoácidos potenciadores de actividad, para determinar si se ha producido retención de la propiedad o característica deseable.

Se describe posteriormente un ejemplo del uso de un “enfoque de mutagénesis selectivo”, en la mutagénesis de Y61. Las mutaciones individuales H31 S→E, L50→Y, o L94G→Y mejoraron cada una la actividad de neutralización del anticuerpo. Sin embargo, cuando se ensayaron clones de combinación, la actividad del clon combinado H31 S→E + L50→Y + L94G→Y no fue mejor que L50→Y + L94G→Y (J695). Por lo tanto, cambiar el resto de aminoácido de línea germinal Ser a Glu en la posición 31 de CDR1 fue innecesario para la actividad mejorada de J695 frente a Y61. El enfoque de mutagénesis selectiva por lo tanto identificó el número mínimo de cambios que contribuían a la

actividad final, reduciendo de este modo el potencial inmunogénico del anticuerpo final y conservando otras propiedades deseadas del anticuerpo.

El ADN aislado que codifica la VH y VL producidas por el enfoque de mutagénesis seleccionada puede convertirse a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmento Fab como a un gen scFV, como se describe en la sección IV. Para la expresión de regiones VH y VL producidas por el enfoque de mutagénesis seleccionada, los vectores de expresión que codifican la cadena pesada y ligera pueden transfectarse a diversas células hospedadoras como se describe en detalle en la sección IV. Las células hospedadoras preferidas incluyen células hospedadoras procariontes, por ejemplo, *E. coli*, o células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, células de levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*. Las células hospedadoras eucariotas más preferidas son células hospedadoras de mamífero, descritas en detalle en la sección IV.

El enfoque de mutagénesis selectiva proporciona un método para producir anticuerpos con actividades mejoradas sin maduración de afinidad anterior del anticuerpo por otro medio. El enfoque de mutagénesis selectiva proporciona un método para producir anticuerpos con afinidades mejoradas que se han sometido a retromutaciones. El enfoque de mutagénesis selectiva también proporciona un método para mejorar la actividad de anticuerpos de afinidad madurada.

El experto en la materia reconocerá que el enfoque de mutagénesis selectiva puede usarse en técnicas de manipulación de anticuerpos convencionales conocidas en la materia. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos con injertos de CDR, anticuerpos quiméricos, fragmentos scFV, fragmentos Fab de un anticuerpo de longitud completa y anticuerpos humanos de otras fuentes, por ejemplo, ratones transgénicos.

El análisis mutacional a gran escala rápido de anticuerpos incluye transcripción y traducción *in vitro* usando tecnología de presentación de ribosomas (véase por ejemplo, Hanes *et al.*, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 4937-4942; Dall'Acqua *et al.*, (1998) Curr. Opin. Struc. Biol. 8: 443-450; He *et al.*, (1997) Nucleic Acid Res. 25: 5132-5134), y Patentes de Estados Unidos N° 5.643.768 y 5.658.754 expedidas a Kawasaki. El enfoque de mutagénesis selectiva también proporciona un método para producir anticuerpos con actividades mejoradas que pueden seleccionarse usando técnicas de presentación de ribosomas.

En los métodos de la invención, los anticuerpos o parte de un ionógeno de los mismos se modifican adicionalmente alterando posiciones individuales en las CDR de la HCVR y/o LCVR. Aunque estas modificaciones pueden realizarse en anticuerpos presentados en fagos, el método es ventajoso porque puede realizarse con anticuerpos que se expresan en otros tipos de sistemas hospedadores, tales como sistemas de expresión de células bacterianas, de levadura o de mamífero. Las posiciones individuales dentro de la CDR seleccionadas para modificación se basan en que las posiciones son un contacto y/o posición de hipermutación.

Se muestran posiciones de hipermutación y posiciones de contacto preferidas como se definen en este documento en la Tabla 3 (véase Apéndice A) y su modificación de acuerdo con el método de la invención se describe en detalle en el Ejemplo 2. Se seleccionan posiciones de contacto preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96. Se seleccionan posiciones de hipermutación preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 y L93. Los restos de aminoácidos más preferidos (denominados "posiciones de mutagénesis selectiva preferidas") son posiciones tanto de contacto como de hipermutación y se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94. Se seleccionan posiciones de contacto particularmente preferidas del grupo que consiste en L50 y L94.

Los restos de aminoácidos potenciadores de actividad preferidos reemplazan restos de aminoácidos localizados en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96. Los restos de aminoácidos potenciadores de actividad más preferidos reemplazan restos de aminoácidos localizados en las posiciones H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94. Particularmente, los restos de aminoácidos potenciadores de actividad preferidos reemplazan restos de aminoácidos localizados en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L50 y L94.

En general, el método de la invención implica seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida particular, posición de contacto y/o hipermutación dentro de una CDR de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo parental de interés, o parte de unión a antígeno del mismo, mutando de forma aleatoria esa posición individual (por ejemplo, por métodos genéticos usando un oligonucleótido mutagénico para generar una "minibiblioteca" de anticuerpos modificados), o mutando una posición a aminoácidos deseados específicos, para identificar restos de aminoácidos potenciadores de actividad expresando y purificando los anticuerpos modificados (por ejemplo, en un sistema hospedador de presentación no en fagos), midiendo la actividad de los anticuerpos modificados para antígeno (por ejemplo, midiendo las velocidades K_{off} por análisis de BIACore) repitiendo estas etapas para otras posiciones de CDR, según sea necesario, y combinando mutaciones individuales que se ha demostrado que tienen actividad mejorada y ensayando si la combinación o las combinaciones generan un anticuerpo con actividad aún mayor (por

ejemplo, afinidad o potencia de neutralización) que el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

En consecuencia, en una realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- 5 a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;
- b) seleccionar en orden un a 1) posición de mutagénesis selectiva preferida; 2) posición de contacto o 3) posición de hipermutación dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación, identificando de este modo una posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación;
- 10 c) mutar individualmente dicha posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpo mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos;
- d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;
- 15 e) opcionalmente, repetir las etapas a) a d) para al menos otra posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación;
- f) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, mutaciones individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y
- 20 g) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;

25 hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo o los anticuerpos seleccionados tienen una actividad mejorada sin pérdida o con retención de al menos una característica o propiedad deseable del anticuerpo parental como se ha descrito anteriormente. La característica o propiedad deseable puede medirse u observarse por el experto habitual en la materia usando técnicas reconocidas en la materia.

30 Las posiciones de contacto preferidas se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96. Las posiciones de hipermutación preferidas se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94. Se seleccionan posiciones de mutagénesis selectiva más preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 y L93.

35 Se seleccionan posiciones de contacto particularmente preferidas del grupo que consiste en L50 y L94.

En otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- 40 a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;
- b) seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación;
- c) mutar individualmente dicha posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos;
- 45 d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;
- e) opcionalmente, repetir las etapas a) a d) para al menos otra posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación;
- 50 f) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo o dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y
- 55 g) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, con dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;

hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

60 Se seleccionan posiciones de contacto preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96. Se seleccionan posiciones de hipermutación preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 y L93. Se seleccionan posiciones de mutagénesis selectiva más preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93 y L94. Se seleccionan posiciones de contacto particularmente preferidas del grupo que consiste en L50 y L94.

65

En otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;
- 5 b) seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación;
- c) mutar individualmente dicha posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos;
- 10 d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;
- e) opcionalmente, repetir las etapas a) a d) para al menos otra posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación;
- 15 f) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, tres restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y
- g) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, con dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;
- 20

hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

- 25 Preferiblemente, el resto de aminoácido potenciador de actividad reemplaza restos de aminoácidos localizados en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96.

- Después de mutagénesis de posiciones seleccionadas individuales, pueden secuenciarse clones mutados para identificar qué restos de aminoácidos se han introducido en la posición seleccionada en cada clon. Puede seleccionarse un número pequeño de clones (por ejemplo, aproximadamente 24) para secuenciación, lo que estadísticamente produciría 10-15 anticuerpos únicos, mientras que puede secuenciarse números mayores de clones (por ejemplo más de 60) para asegurar que se identifiquen anticuerpos con cada posible sustitución en la posición seleccionada.
- 30

- 35 En una realización, las posiciones de contacto y/o hipermutación dentro de las regiones CDR3 de las cadenas pesada y/o ligera se seleccionan en primer lugar para mutagénesis. Sin embargo, para anticuerpos que ya se han madurado con respecto a afinidad *in vitro* por mutagénesis aleatoria de las regiones CDR3 mediante selección de presentación de fagos, puede ser preferible seleccionar en primer lugar las posiciones de contacto y/o hipermutación dentro de CDR1 o CDR2 de la cadena pesada y/o ligera.
- 40

- 45 En una realización más preferida, las posiciones de mutagénesis selectiva preferidas dentro de las regiones CDR3 de las cadenas pesada y/o ligera se seleccionan en primer lugar para mutagénesis. Sin embargo, para anticuerpos que ya se han madurado con respecto a afinidad *in vitro* por mutagénesis aleatoria de las regiones CDR3 mediante selección de presentación de fagos, puede ser preferible seleccionar en primer lugar posiciones de mutagénesis selectiva preferidas dentro de CDR1 o CDR2 de la cadena pesada y/o ligera.

- 50 En otra realización preferida, la optimización de un anticuerpo seleccionado por el enfoque de mutagénesis selectiva se realiza secuencialmente como sigue: se mutan posiciones de mutagénesis selectiva preferidas seleccionadas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 en primer lugar a al menos otros dos aminoácidos cada una (preferiblemente 5-14 aminoácidos distintos) y los anticuerpos resultantes se caracterizan con respecto a afinidad aumentada, potencia de neutralización (y posiblemente también con respecto a al menos otra característica conservada o propiedad analizada en otro lugar). Si una mutación de una posición de mutagénesis selectiva preferida sencilla no aumenta la afinidad o potencia de neutralización en absoluto o de forma suficiente y si incluso la combinación de múltiples aminoácidos potenciadores de actividad que reemplazan aminoácidos en posiciones de mutagénesis selectiva preferidos no da como resultado un anticuerpo de combinación que cumple la actividadiana (incluyendo afinidad y/o potencia de neutralización), se seleccionarán restos de aminoácidos adicionales para mutagénesis selectiva del grupo que consiste en H35, H50, H53, H54, H95, H96, H97, H98, L30A y L96, se mutan al menos a otros 2 aminoácidos cada uno (preferiblemente 5-14 aminoácidos distintos) y los anticuerpos resultantes se caracterizan con respecto a afinidad aumentada, potencia de neutralización (y posiblemente también con respecto a al menos otra característica conservada o propiedad analizada en otro sitio).
- 55
- 60

- 65 Si una mutación de un resto de aminoácido sencillo seleccionado del grupo que consiste en H35, H50, H53, H54, H95, H96, H97, H98, L30A y L96 no aumenta la actividad (incluyendo afinidad y/o potencia de neutralización) en absoluto o no de forma suficiente y si incluso una combinación de múltiples aminoácidos potenciadores de actividad

que reemplazan aminoácidos en esas posiciones no da como resultado un anticuerpo de combinación que cumple la actividad diana (incluyendo afinidad y/o potencia de neutralización diana), se seleccionarán restos de aminoácidos adicionales para mutagénesis selectiva del grupo que consiste en H33B, H52B, L31A y se mutan al menos a otros 2 aminoácidos cada uno (preferiblemente 5-14 aminoácidos distintos) y los anticuerpos resultantes se caracterizan con respecto a afinidad aumentada, potencia de neutralización (y posiblemente también con respecto a al menos otra característica conservada o propiedad analizada en otro sitio).

Debería entenderse que el enfoque de mutagénesis selectiva secuencial puede terminar en cualquiera de las etapas perfiladas anteriormente en cuanto se ha identificado un anticuerpo con la actividad deseada (incluyendo afinidad y potencia de neutralización). Si la mutagénesis de las posiciones preseleccionadas ha identificado restos de aminoácidos potenciadores de actividad pero el anticuerpo de combinación aún no cumple las dianas establecidas para actividad (incluyendo afinidad y potencia de neutralización) y/o si los aminoácidos potenciadores de actividad identificados también afectan a otras características deseadas y por lo tanto no son aceptables, los restos de CDR restantes pueden someterse a mutagénesis (véase sección IV).

El método de la invención puede usarse para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para conseguir una actividad diana predeterminada (por ejemplo una afinidad predeterminada y/o potencia de neutralización, y/o una propiedad o característica deseada).

En consecuencia, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, para conseguir una actividad diana predeterminada, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo:

b) seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94.

c) mutar individualmente la posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear un primer panel de anticuerpo mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos;

d) evaluar la actividad del primer panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, para determinar si la mutación de una posición de mutagénesis selectiva sencilla produce un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo con la actividad diana predeterminada o una actividad diana parcial;

e) combinar por etapas, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, mutaciones individuales que se ha mostrado que tienen una actividad mejorada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos;

f) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos para determinar si los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, tienen la actividad diana predeterminada o una actividad diana parcial.

g) si las etapas d) o f) no dan como resultado anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que tenga la actividad diana predeterminada, o dan como resultado un anticuerpo con solamente una actividad parcial, se mutan restos de aminoácidos adicionales seleccionados del grupo que consiste en H35, H50, H53, H54, H95, H96, H97, H98, L30A y L96 a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un segundo panel de anticuerpos mutados o partes de unión a antígenos de los mismos;

h) evaluar la actividad del segundo panel de anticuerpos mutados o partes de unión a antígeno de los mismos, para determinar si la mutación de un resto de aminoácido sencillo seleccionado del grupo que consiste en H35, H50, H53, H54, H95, H96, H97, H98, L30A y L96 da como resultado un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, que tenga la actividad diana predeterminada o una actividad parcial;

i) combinar por etapas en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, mutaciones individuales de la etapa g) que se ha mostrado que tienen una actividad mejorada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos;

j) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, para determinar si los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, tienen la actividad diana predeterminada o una actividad diana parcial.

k) si las etapas h) o j) no dan como resultado un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que tenga la actividad diana predeterminada, o dan como resultado un anticuerpo con solamente una actividad parcial, se mutan restos de aminoácidos adicionales seleccionados del grupo que consiste en H33B, H52B y L31A a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un tercer panel de anticuerpos mutados o partes de unión a antígeno de los mismos;

l) evaluar la actividad del tercer panel de anticuerpos mutados o partes de unión a antígeno de los mismos, para determinar si una mutación de un resto de aminoácido sencillo seleccionado del grupo que consiste en H33B, H52B y L31A dio como resultado un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, que tuviera la actividad diana predeterminada o una actividad parcial;

m) combinar por etapas en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, mutaciones individuales de la etapa k) que se ha mostrado que tienen una actividad mejorada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos;

n) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, para determinar si los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, tienen la actividad

diana predeterminada para producir de este modo un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo con una actividad diana predeterminada.

Pueden usarse varios métodos de mutagénesis, incluyendo ensamblaje de PCR, Kunkel (dut-ung-) y mutagénesis dirigida por oligonucleótido trifosfato (kit Amersham Sculptor).

Pueden usarse una amplia diversidad de sistemas de expresión hospedadores para expresar los anticuerpos mutados, incluyendo sistemas de expresión bacterianos, de levadura, bacteriofagos y de mamífero (así como sistemas de expresión de presentación de fagos). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC 119(Sfi). Se conocen otros sistemas de expresión de anticuerpos en la técnica y/o se describen posteriormente en la sección IV.

Los anticuerpos modificados, o partes de unión a antígeno de los mismos, producidos por el método de la invención pueden identificarse sin basarse en métodos de presentación de fagos para selección. En consecuencia, el método de la invención es particularmente ventajoso para mejorar la actividad de un anticuerpo parental recombinante o parte de unión a antígeno del mismo, que se obtuvo por selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en el sistema de presentación de fagos.

En consecuencia, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la afinidad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental recombinante o parte de unión a antígeno del mismo; que se obtuvo por selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en dicho sistema de presentación de fagos;

b) seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación, identificando de este modo una posición de contacto o hipermutación seleccionada;

c) mutar individualmente dicha posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpo mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, y expresar dicho panel en un sistema de presentación no de fagos;

d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;

e) opcionalmente, repetir las etapas b) a d) para al menos otra posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación;

f) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo mutaciones individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y

g) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

Se seleccionan posiciones de contacto preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96. Se seleccionan posiciones de hipermutación preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 y L93. Se seleccionan posiciones de mutagénesis selectiva más preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93 y L94. Se seleccionan posiciones de contacto particularmente preferidas del grupo que consiste en L50 y L94.

Con los métodos disponibles no es posible o es extremadamente laborioso derivar un anticuerpo con afinidad de unión y potencia de neutralización aumentadas conservando a la vez otras propiedades o características de los anticuerpos como se ha analizado anteriormente. El método de la presente invención, sin embargo, puede identificar fácilmente tales anticuerpos. Los anticuerpos sometidos al método de la presente invención pueden venir de cualquier fuente.

Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental recombinante o parte de unión a antígeno del mismo;

b) seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación, identificando de este modo una posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación;

c) mutar individualmente dicha posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpo mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, y expresar dicho panel en un sistema de expresión

apropiado;

d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo, identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;

5 e) evaluar el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo para al menos otra propiedad o característica, en el que la propiedad o característica es una que se necesita conservar en el anticuerpo;

10 hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y al menos una propiedad o característica conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

15 En una realización preferida, las posiciones de contacto preferidas se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer el epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando la interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

20 En otra realización preferida, las posiciones de hipermutación se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 y L93 y las otras características se seleccionan de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

30 En una realización más preferida, los restos para mutagénesis selectiva se seleccionan de las posiciones de mutagénesis selectiva preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 y las otras características se seleccionan de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

35 En una realización más preferida, las posiciones de contacto se seleccionan del grupo que consiste en L50 y L94 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

40 Si, por lo tanto, la afinidad de un anticuerpo por un antígeno específico se mejorara, pero cuando ya no es aplicable el método de presentación de fagos (o sistema relacionado incluyendo presentación de ribosomas), y se conservaran o tras propiedades o características deseables, podría usarse el método de la invención. En consecuencia, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental recombinante o parte de unión a antígeno del mismo; que se obtuvo por selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en dicho sistema de presentación de fagos;

50 b) seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación, identificando de este modo una posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación;

55 c) mutar individualmente dicha posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, y expresar dicho panel en un sistema de presentación no de fagos;

d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;

60 e) evaluar el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo para al menos otra propiedad o característica distinta, en el que la propiedad o característica es una que se necesita conservar, hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y al menos una propiedad o característica conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo,

65 f) opcionalmente, repetir las etapas a) a e) para al menos otra posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación;

g) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo o al menos dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada y al menos una propiedad o característica conservada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y

h) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;

hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y al menos otra propiedad o característica conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

En una realización preferida, las posiciones de contacto preferidas se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En otra realización preferida, las posiciones de hipermutación se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 y L93 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En una realización más preferida, los restos de mutagénesis selectiva se seleccionan de las posiciones de mutagénesis selectiva preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando la interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En una realización más preferida, las posiciones de contacto se seleccionan del grupo que consiste en L50 y L94 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental recombinante o parte de unión a antígeno del mismo; que se obtuvo por selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya ya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en dicho sistema de presentación de fagos;

b) seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación, identificando de este modo una posición de contacto o hipermutación seleccionada;

c) mutar individualmente dicha posición de mutagénesis selectiva preferida seleccionada, posición de contacto o hipermutación a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, y expresar dicho panel en un sistema de presentación no de fagos;

d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;

e) evaluar el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo para al menos otra propiedad o característica, en el que la propiedad o característica es una que se necesita conservar, hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y al menos una propiedad o característica conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

En una realización preferida, las posiciones de contacto preferidas se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítipo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando la interferencia

de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En otra realización preferida, las posiciones de hipermutación se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 y L93 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítomos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En una realización más preferida, los restos para mutagénesis selectiva se seleccionan de las posiciones de mutagénesis selectiva preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítomos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En una realización más preferida, las posiciones de contacto se seleccionan del grupo que consiste en L50 y L94 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítomos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental recombinante o parte de unión a antígeno del mismo; que se obtuvo por selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en dicho sistema de presentación de fagos;

b) seleccionar una posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación, identificando de este modo una posición de contacto o hipermutación seleccionada;

c) mutar individualmente dichas posiciones de mutagénesis selectiva preferidas seleccionadas, posiciones de contacto o hipermutación a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, y expresar dicho panel en un sistema de presentación no de fagos;

d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;

e) evaluar el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo para al menos otra propiedad o característica, en el que la propiedad o característica es una que necesita conservarse, hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y al menos una característica conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

f) opcionalmente, repetir las etapas a) a e) para al menos otra posición de mutagénesis selectiva preferida, posición de contacto o hipermutación;

g) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, a al menos dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada y al menos otra característica conservada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y

h) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;

hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y al menos una propiedad o característica conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

En una realización preferida, las posiciones de contacto se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítomos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En otra realización preferida, las posiciones de hipermutación se seleccionan del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L53 y L93 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En una realización más preferida, los restos para mutagénesis selectiva se seleccionan de las posiciones de mutagénesis selectiva preferidas del grupo que consiste en H30, H31, H31B, H32, H33, H52, H56, H58, L30, L31, L32, L50, L91, L92, L93, L94 y las otras características se seleccionan de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

En una realización más preferida, las posiciones de contacto se seleccionan del grupo que consiste en L50 y L94 y la otra característica se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

IV. Modificaciones de otros restos de CDR

En última instancia, todos los restos de CDR en un par de anticuerpo-antígeno dado que se ha identificado por cualquier medio que se requieren como restos de aminoácidos potenciadores de actividad y/o se requieren directa o indirectamente para unión con el antígeno y/o para conservar otras propiedades o características deseables del anticuerpo. Tales restos de CDR se denominan "posiciones de mutagénesis selectiva preferidas". Debería observarse que en circunstancias específicas los restos de mutagénesis selectiva preferidos pueden identificarse también por otros medios incluyendo cocrystalización de anticuerpo y antígeno y modelización molecular.

Si los intentos preferidos para identificar aminoácidos potenciadores de actividad centrándose en las posiciones de mutagénesis selectiva preferidas, posiciones de contacto o hipermutación descritas anteriormente se agotan, o si se requieren mejoras adicionales, los restos de CDR restantes pueden modificarse como se describe posteriormente. Debería entenderse que el anticuerpo ya podría estar modificado en una cualquiera o más de las posiciones de contacto o hipermutación de acuerdo con las realizaciones analizadas anteriormente pero puede requerir mejoras adicionales. Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;
- seleccionar un resto de aminoácido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación distinta de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;
- mutar individualmente dicha posición seleccionada por ejemplo, a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un anticuerpo mutado, o un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos;
- evaluar la actividad del anticuerpo mutado o el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;
- evaluar el anticuerpo mutado o el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo, con respecto a cambios en al menos otra propiedad o característica hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

Preferiblemente, la otra característica o propiedad se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

Si la mutagénesis de un resto sencillo no es suficiente pueden incluirse otros restos; por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- proporcionar un anticuerpo parental recombinante o parte de unión a antígeno del mismo;
- seleccionar un resto de aminoácido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación distinta de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;

- c) mutar individualmente dicha posición seleccionada a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos;
- d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;
- 5 e) repetir las etapas b) a d) para al menos otra posición de CDR que no es la posición seleccionada en b) ni una posición en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;
- 10 f) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo al menos dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y
- g) evaluar la actividad de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos con dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.
- 15 Si los intentos preferidos para identificar aminoácidos potenciadores de actividad centrándose en las posiciones de contacto o hipermutación descritas anteriormente se agotan, o si se requieren mejoras adicionales, y el anticuerpo en cuestión no puede optimizarse adicionalmente por métodos de mutagénesis y presentación de fagos (o presentación de ribosomas relacionada) los restos de CDR restantes pueden modificarse como se describe posteriormente. Debería entenderse que el anticuerpo puede ya estar modificado en una cualquiera o más posiciones de mutagénesis selectiva preferidas, posiciones de contacto o hipermutación y acurdo con las realizaciones analizadas anteriormente pero puede requerir mejoras adicionales.
- 20 Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- 25 a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; que se obtuvo por selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en dicho sistema de presentación de fagos;
- 30 b) seleccionar un resto de aminoácido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación distinta de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y;
- 35 c) mutar individualmente dicha posición de contacto o hipermutación seleccionada a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, y expresar dicho panel en un sistema de presentación no de fagos;
- d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;
- 40 e) evaluar el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo, con respecto a cambios en al menos otra propiedad o característica, hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.
- 45 Preferiblemente, la otra característica o propiedad se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítomos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.
- 50 Si una mutagénesis sencilla no es suficiente para aumentar la afinidad del anticuerpo pueden incluirse otros restos en la mutagénesis. Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- 55 a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; que se obtuvo por selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en dicho sistema de presentación de fagos;
- b) seleccionar un resto de aminoácido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación distinta de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;
- 60 c) mutar individualmente dicha posición seleccionada a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos y expresión en un sistema de presentación no de fagos;
- d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;
- 65 e) repetir las etapas b) a d) para al menos otra posición que no es la posición seleccionada en b) ni una posición

en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94;

g) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, al menos dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada, para

formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y
h) evaluar la actividad y otra propiedad o característica de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos con dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;

hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

Preferiblemente, la otra característica o propiedad se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítomos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

Los intentos preferidos para identificar aminoácidos potenciadores de actividad centrándose en las posiciones de mutagénesis selectivas preferidas, posiciones de contacto o hipermutación descritas pueden agotarse, o pueden requerirse mejoras adicionales, y es importante conservar otras propiedades o características del anticuerpo.

Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, sin afectar a otras características, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;
b) seleccionar un resto de aminoácido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación distinta de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;

c) mutar individualmente dicha posición seleccionada a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos;

d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;

e) evaluar el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo, con respecto a cambios en al menos otra propiedad o característica hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y otra propiedad o característica conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

Preferiblemente, la otra característica o propiedad se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítomos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

Si la mutagénesis de un resto sencillo no es suficiente pueden incluirse otros restos; por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo;
b) seleccionar un resto de aminoácido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para mutación distinta de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;

c) mutar individualmente dicha posición seleccionada a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos;

d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;

e) evaluar el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo, con respecto a cambios en al menos otra característica o propiedad;

e) repetir las etapas b) a e) para al menos otra posición de CDR que no es la posición seleccionada en b) ni una posición en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;

f) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, al menos dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada y sin afectar al menos a otra propiedad o característica, para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a

antígeno de los mismos; y

g) evaluar la actividad y la conservación de al menos otra propiedad o característica de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, con dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y al menos otra propiedad o característica conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

La mutagénesis de la posición de mutagénesis selectiva preferida, resto de contacto e hipermutación puede no haber aumentado la afinidad del anticuerpo de forma suficiente, y la mutagénesis y el método de presentación de fagos (o método de presentación de ribosomas relacionados) pueden no ser ya útiles y al menos debería conservarse otra característica o propiedad del anticuerpo.

Por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la afinidad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; que se obtuvo mediante selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en dicho sistema de presentación de fagos;

b) seleccionar un resto de aminoácido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para una mutación distinta de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;

c) mutar individualmente dicha posición seleccionada a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos y expresión en un sistema de presentación no de fagos;

d) evaluar la actividad del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;

e) evaluar el panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo, con respecto a cambios en al menos otra propiedad o característica hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

Preferiblemente, la otra característica o propiedad se selecciona de 1) conservación de ausencia de reactividad cruzada con otras proteínas o tejidos humanos, 2) conservación de reconocimiento de epítopos, es decir reconocer epítopo p40 preferiblemente en el contexto del heterodímero p70 p40/p35 evitando interferencia de unión de p40 soluble libre y/o 3) producir un anticuerpo con una secuencia de inmunoglobulina cercana a línea germinal.

Si la mutagénesis de un resto sencillo no es suficiente pueden incluirse otros restos; por lo tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para mejorar la actividad de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) proporcionar un anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; que se obtuvo por selección en un sistema de presentación de fagos pero cuya actividad no puede mejorarse adicionalmente por mutagénesis en dicho sistema de presentación de fagos;

b) seleccionar un resto de aminoácido dentro de una región determinante de complementariedad (CDR) para una mutación distinta de H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;

c) mutar individualmente dicha posición seleccionada a al menos otros dos restos de aminoácidos para crear de este modo un panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, y expresión en un sistema de presentación no de fagos;

d) evaluar la actividad y conservación de al menos otra propiedad o característica del panel de anticuerpos mutados, o partes de unión a antígeno de los mismos, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo; identificando de este modo un resto de aminoácido potenciador de actividad;

e) repetir las etapas b) a d) para al menos otra posición de CDR que no es la posición seleccionada en b) ni una posición en H30, H31, H31B, H32, H33, H35, H50, H52, H52A, H53, H54, H56, H58, H95, H96, H97, H98, H101, L30, L31, L32, L34, L50, L52, L53, L55, L91, L92, L93, L94 y L96;

f) combinar, en el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo, al menos dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad individuales que se ha mostrado que tienen actividad mejorada y que no afectan al menos a otra propiedad o característica para formar anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos; y

g) evaluar la actividad y conservación de al menos una propiedad o característica de los anticuerpos de combinación, o partes de unión a antígeno de los mismos, con dos restos de aminoácidos potenciadores de actividad, en relación con el anticuerpo parental o parte de unión a antígeno del mismo hasta que se obtenga un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, con una actividad mejorada y al menos otra característica o propiedad conservada, en relación con el anticuerpo parental, o parte de unión a antígeno del mismo.

V. Expresión de anticuerpos

Un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención puede prepararse por expresión recombinante de genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina en una célula hospedadora. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, una célula hospedadora se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligera y pesada se expresen en la célula hospedadora y, preferiblemente, se secreten al medio en el que las células hospedadoras se cultivan, de cuyo medio pueden recuperarse los anticuerpos. Se usan metodologías de ADN recombinante convencionales para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células hospedadoras, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.397 de Boss *et al.*

Para obtener un fragmento de ADN codificante de la región variable de cadena pesada de Joe 9 wt o un anticuerpo relacionado con Joe 9 wt, se exploraron anticuerpos específicos para IL-12 humana a partir de bibliotecas humanas y se mutaron, como se describe en la sección II. Una vez que se obtuvieron fragmentos de ADN que codificaban Joe 9 wt o segmentos VH y VL relacionados con Joe 9 wt, se lleva a cabo mutagénesis de estas secuencias por métodos convencionales, tales como mutagénesis dirigida por PCR (la mutagénesis mediada por PCR en la que los nucleótidos mutados se incorporan a los cebadores de PCR de modo que el producto de PCR contenga las mutaciones) u otros métodos de mutagénesis dirigida. Se manipularon adicionalmente anticuerpos de IL-12 humana que presentaban un nivel de actividad y afinidad/especificidad de unión que era deseable, por ejemplo J695, por técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo para convertir los genes de región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmentos Fab o a un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlace flexible. La expresión "unido operativamente", como se usa en el presente contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan en fase.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN codificante de VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanos se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones por amplificación por PCR. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD y cualquier variante alotípica de ellas como se describe en Kabat (, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242), pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmentos Fab, el ADN que codifica VH puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante de CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse a un gen de cadena ligera de longitud completa, (así como un gen de cadena ligera Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero más preferiblemente es una región constante lambda.

Para crear un gen scFv los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente con otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de modo que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por enlazador flexible (véase por ejemplo Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348: 552-554).

Para expresar los anticuerpos, o partes de anticuerpos de la invención, se insertan ADN que codifican cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o parciales, obtenidas como se ha descrito anteriormente, en vectores de expresión de modo que los genes estén unidos operativamente con secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "unido operativamente" pretende referirse a que un gen de anticuerpos se liga a un vector de modo que las secuencias de control de la traducción y la transcripción dentro del vector cumplan su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de

anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos convencionales (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción del J695 o las secuencias de cadena pesada o ligera relacionadas con J695, el vector de expresión puede ya portar secuencias de región constante de anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir el J695 o secuencias VH y VL relacionadas con J695 a genes de anticuerpos de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera, respectivamente, de modo que el segmento VH esté unido operativamente al segmento o los segmentos CH dentro del vector y el segmento VL esté unido operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal se une en fase con el extremo amino terminal del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadenas de anticuerpos. Para secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Se apreciará por los expertos en la materia que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras puede depender de tales factores como la elección de la célula hospedadora para transformar, el nivel de expresión de la proteína deseadas, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para expresión en célula hospedadora de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión proteica en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), Virus de Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y poliovirus. Para descripción adicional de elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos, véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.168.062 de Stinski, Patente de Estados Unidos Nº 4.510.245 de Bell *et al.* y Patente de Estados Unidos Nº 4.968.615 de Schaffner *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.464.758 de Bujard *et al.* y Patente de Estados Unidos Nº 5.654.168 de Bujard *et al.*

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tal es como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación de metotrexato) y el gen *neo* (para selección de G418).

Para expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfecta a una célula hospedadora por técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas y más preferiblemente células hospedadoras de mamífero, es la más preferida debido a que tales células eucariotas, y en particular células de mamífero, tiene más probabilidades que las células procariotas de ensamblarse y secretar un anticuerpo plegado de forma apropiada e inmunológicamente activo. Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se dejan crecer las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Las células hospedadoras también pueden usarse para producir partes de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con un ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la presente invención. También puede usarse tecnología de ADN recombinante para retirar parte o todo el ADN que codifica una o ambas

de las cadenas ligera y pesada que no son necesarias para unión a hIL-12. Las moléculas expresadas de tales moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los anticuerpos de la invención. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas de un antígeno distinto de hIL-12 entrecruzando un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos de entrecruzamiento químico convencionales.

En un sistema preferido para expresión recombinante de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de anticuerpo como la cadena ligera de anticuerpos se introduce en células CHO dhfr- por transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo están clonados operativamente a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para conducir niveles altos de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación por metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo y se recupera anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Pueden expresarse anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos en un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo, Taylor, L. D. *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295). También pueden modificarse células vegetales para crear plantas transgénicas que expresan el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención.

En la vista de lo anterior, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones de ácido nucleico, vector y células hospedadoras que pueden usarse para expresión recombinante de los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención. Preferiblemente, la invención presenta ácidos nucleicos aislados que codifican CDR de J695, o la región variable de cadena pesada y/o ligera completa de J695. En consecuencia, en una realización, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humano, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, en el que el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende la CDR3 de cadena pesada de J695 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25.

Preferiblemente, el anticuerpo codificado o parte de unión a antígeno del mismo, comprende adicionalmente una CDR2 de cadena pesada de J695 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27. Más preferiblemente, el anticuerpo codificado o parte de unión a antígeno del mismo, comprende adicionalmente una CDR1 de cadena pesada de J695 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29. Aún más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31 (la región VH completa de J695).

En otras realizaciones, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humano, o parte de unión a antígeno del mismo, de la invención, en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, comprende la CDR3 de cadena ligera de J695 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26. Preferiblemente, el anticuerpo codificado o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR2 de cadena ligera de J695 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28. Más preferiblemente, el anticuerpo codificado, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR1 de cadena ligera de J695 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30. Aún más preferiblemente, el ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32 (la región VL completa de J695).

La invención también proporciona un vector de expresión recombinante que codifica:

- a) una cadena pesada de anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31; y
- b) una cadena ligera de anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32.

La invención también proporciona células hospedadoras en las que se han introducido uno o más de los vectores de expresión recombinantes de la invención. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero, más preferiblemente la célula hospedadora es una célula CHO, una célula NS0 o una célula COS. Además la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo humano recombinante de la invención cultivando una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo humano recombinante de la invención. El método puede comprender adicionalmente aislar el anticuerpo humano recombinante del medio de cultivo.

VI. Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

Los anticuerpos y partes de anticuerpos de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, de xtrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias adyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian el período de validez o eficacia del anticuerpo o parte de anticuerpo.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferiblemente, el anticuerpo o partes de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable que contiene anticuerpo 0,1-250 mg/ml. La solución inyectable puede componerse de una forma de dosificación líquida liofilizada en un frasco de siflex o ámbar, ampolla o jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, pH 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen pero sin limitación, sucinato sódico, citrato sódico, fosfato sódico o fosfato potásico. Puede usarse cloruro sódico para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa 0-10% (óptimamente 0,5-1,0%). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Pueden incluirse agentes para aumentar el volumen para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol 1-10% (óptimamente 2-4%). Pueden utilizarse estabilizadores en formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes para aumentar el volumen adecuados incluyen glicina, arginina, pueden incluirse como polisorbato 80 0-0,05% (óptimamente 0,005-0,01%). Los tensioactivos adicionales incluyen pero sin limitación polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ.

En una realización preferida, la composición farmacéutica incluye al anticuerpo a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg-10 mg/kg. Las dosificaciones más preferidas del anticuerpo incluyen 1 mg/kg administrado cada dos semanas, o 0,3 mg/kg administrado semanalmente.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo preferido de administración es parenteral (por ejemplo, intra venosa, subcutánea, intra peritoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estas en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (es decir anticuerpo o parte de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes e numerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles liofilizados, para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por pulverización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidizabilidad de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede proporcionarse absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente invención pueden administrarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo preferido de administración es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía/modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto contra liberación

rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenvinil acetato, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o se conocen en general por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros principios, si se desea) también pueden estar incluidos en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos que pueden ingerirse, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, e lixires, suspensiones, jarabes, o bleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención por una administración distinta de la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

También pueden incorporarse compuestos activos complementarios a las composiciones. En ciertas realizaciones un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención se formula conjuntamente con y/o se coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que la actividad de IL-12 es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hIL-12 o parte de anticuerpo de la invención puede formularse conjuntamente y/o coadministrarse con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citocinas o que se unen a moléculas de superficie celular). Además, puede usarse uno o más anticuerpos de la invención en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar provechosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Se apreciará por el experto en la materia que cuando se usan los anticuerpos de la invención como parte de una terapia de combinación, puede ser deseable una dosificación de anticuerpo menor que cuando se administra el anticuerpo solo a un sujeto (por ejemplo, puede conseguirse un efecto terapéutico sinérgico a través del uso de terapia de combinación que, a su vez, permite el uso de una dosis menor del anticuerpo para conseguir el efecto terapéutico deseado).

La interleucina 12 desempeña un papel crítico en la patología asociada con una diversidad de enfermedades que implican elementos inmunes e inflamatorios. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, esclerodermia de dermatitis, dermatitis atópica, enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmune aguda o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch-Schonlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, uveítis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, síndrome de sepsis, caquexia, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, tumores malignos, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, enfermedad de Addison, deficiencia poliglandular de tipo I esporádica y deficiencia poliglandular de tipo II, síndrome de Schmidt, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (aguda), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica, artropatía colítica ulcerosa, sinovitis enteropática, artropatía asociada con clamidia, yersinia y salmonella, espondiloartropatía, enfermedad ateromatosa/arterioesclerosis, alergia atópica, enfermedad ampollosa autoinmune, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide, enfermedad de IgA lineal, anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica positiva para Coombs, anemia perniciosa adquirida, anemia perniciosa juvenil, encefalitis miálgica/Enfermedad de Royal Free, candidiasis mucocutánea crónica, arteritis de células gigantes, hepatitis esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, Síndrome de Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida, Enfermedades Relacionadas con Inmunodeficiencia Adquirida, Hepatitis C, inmunodeficiencia variada común (hipogammaglobulinemia común), cardiomiopatía dilatada, infertilidad femenina, insuficiencia ovárica, insuficiencia ovárica prematura, enfermedad pulmonar fibrótica, alveolitis fibrótica criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial postinflamatoria, neumonitis intersticial, enfermedad pulmonar intersticial asociada con enfermedad de tejido conectivo, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de tejido conectivo mixto, enfermedad pulmonar intersticial asociada con esclerosis sistémica, enfermedad pulmonar intersticial asociada con artritis reumatoide, enfermedad pulmonar asociada con lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar asociada con dermatomiositis/polimiositis, enfermedad pulmonar asociada con enfermedad de Sjögren, enfermedad pulmonar asociada con espondilitis anquilosante, enfermedad pulmonar difusa vasculítica, enfermedad pulmonar asociada con hem siderosis, enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos, fibrosis de radiación, bronquiolitis obliterante, neumonía eosinófila crónica, enfermedad pulmonar de infiltración linfocítica, enfermedad pulmonar intersticial postinfecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, artritis autoinmune de tipo I (hepatitis autoinmune clásica o lupoides), hepatitis autoinmune de tipo 2 (hepatitis de anticuerpo anti LKM), hipoglucemia mediada por autoinmunidad, resistencia a insulina de tipo B con acantosis nigricans, hipoparatiroidismo, enfermedad inmune

aguda asociada con trasplante de órganos, enfermedad inmune crónica asociada con trasplantes de órganos, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, NOS de enfermedad renal, glomerulonefritis, vasculitis microscópica de los riñones, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso discóide, infertilidad masculina idiopática o NOS, autoinmunidad de espermatozoides, esclerosis múltiple (todos los subtipos), diabetes mellitus insulino dependiente, oftalmia simpática, hipertensión pulmonar secundaria de enfermedad de tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, manifestación pulmonar de poliarteritis nodosa, fibrosis reumática aguda, espondilitis reumatoide, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, enfermedad de Takayasu/arteritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune (enfermedad de Hashimoto), hipertiroidismo autoinmune atrófico, mixoedema primario, uveítis facotónica, vasculitis primaria y vitíligo. Los anticuerpos humanos, y partes de anticuerpo de la invención pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunes, en particular las asociadas con inflamación, incluyendo espondilitis reumatoide, alergia, diabetes autoinmune, uveítis autoinmune.

Preferiblemente, los anticuerpos de la invención o partes de unión a antígeno de los mismos, se usan para tratar artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente y psoriasis, como se describe en más detalle en la sección VII.

Un anticuerpo humano, o parte de anticuerpo, de la invención también puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Los anticuerpos de la invención, o partes de unión a antígeno de los mismos pueden usarse solos o en combinación para tratar tales enfermedades. Debería entenderse que los anticuerpos de la invención o partes de unión a antígeno de los mismos pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el experto en la materia para su fin pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico que se ha reconocido en la técnica que es útil para tratar la enfermedad o afección que se trata por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que transmita un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que efectúe la viscosidad de la composición.

Debería entenderse adicionalmente que las combinaciones que deben incluirse dentro de la presente invención son las combinaciones útiles para su fin pretendido. Los agentes expuestos posteriormente son ilustrativos para fines y no se pretende que sean limitantes. Las combinaciones que son parte de la presente invención pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas posteriores. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función pretendida.

Son combinaciones preferidas fármaco o fármacos antiinflamatorios no esteroideos también denominados AINE que incluyen fármacos como ibuprofeno. Otras combinaciones preferidas son corticosteroides incluyendo prednisolona; los efectos secundarios bien conocidos del uso de esteroides pueden reducirse o incluso eliminarse disminuyendo la dosis de esteroides requerida cuando se tratan pacientes en combinación con los anticuerpos anti-IL-12 de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para artritis reumatoide con los que puede combinarse un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención incluyen en los siguientes: fármaco o fármacos antiinflamatorios supresores de citocinas (AISC); anticuerpos para antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, 1-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o partes de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, o sus ligandos incluyendo CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferidas de agentes terapéuticos pueden intervenir en puntos diferentes en la cascada autoinmune e inflamatoria posterior; los ejemplos preferidos incluyen antagonistas de TNF como anticuerpos de TNF quiméricos, humanizados o humanos, D2E7, (número de serie de solicitud de Estados Unidos 08/599.226 presentada el 9 de febrero de 1996), cA2 (Remicade™), CDP571, fragmentos de anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, CDP870) y receptores de TNF p55 o p75 solubles, derivados de los mismos, (p75T NFR1gG (Enbrel™) o pSSTNFR1gG (Lenercept), receptor de IL-13 soluble (sIL-13) y también inhibidores de enzima convertidora de TNF α (TACE); de forma similar los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, inhibidores de enzima convertidora de interleucina 1, tales como Vx740, o IL-1 RA etc.) pueden ser eficaces por la misma razón. Otras combinaciones preferidas incluyen interleucina 11, anti-P7 y ligando de glicoproteínas p-selectina (PSGL). Otra combinación preferida más son otros interactores clave de la respuesta autoinmune que pueden actuar en paralelo a, dependiendo de o en concierto con la función de IL-12; se prefieren especialmente antagonistas de IL-18 incluyendo anticuerpos de IL-18 o receptores de IL-18 solubles, o proteínas de unión a IL-18. Se ha mostrado que IL-12 e IL-18 tienen funciones solapantes pero distintas y una combinación de antagonistas para ambos puede ser muy eficaz. Otra combinación preferida más son inhibidores anti-CD4 no empobrecedores. Otras combinaciones preferidas más incluyen antagonistas de la ruta coestimuladora CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) incluyendo anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas.

Los anticuerpos de la invención, o partes de unión de los mismos, también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, 6-MP, azatioprina sulfasalazina, mesalazina, olsalazina cloroquina/hidroxicloroquina,

pencilamina, aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina, colchicina, corticosteroides (orales, inhalados y por inyección local), agonistas de beta-2 a drenoceptor (salbutamol, terbutalina, salmeterol), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromilo, quetotifen, ipratropio y oxitropio, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil micofenolato, leflunomida, AINE, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias tales como $TNF\alpha$ o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de MAP quinasa, IRAK, NIK, IKK o p38), inhibidores de enzimas convertoras de IL-1 β (por ejemplo, Vx740), anti-P7s, ligando de glicoproteína p-selectina (PSGL), inhibidores de enzima convertora de $TNF\alpha$ (TACE), inhibidores de señalización de linfocitos T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima convertora de angiotensina, receptores de citocinas solubles y derivados de los mismos (por ejemplo receptores de TNF p55 o p75 solubles y los derivados p75TNFR1gG (Enbrel™) y p55TNFR1gG (Lenercept), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor de IL-13 soluble (sIL-13)) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β). Las combinaciones preferidas incluyen metotrexato o leflunomida y en casos de artritis reumatoide moderada o grave, ciclosporina.

Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para enfermedad inflamatoria del intestino con los que puede combinarse un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β ; anticuerpos monoclonales anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de elastasa; compuestos de pirimidil-imidazol; anticuerpos para o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF , LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o partes de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o partes de unión a antígeno de los mismos, también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil micofenolato, leflunomida, AINE, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias tales como $TNF\alpha$ o IL-1 (por ejemplo inhibidores de MAP quinasa, IRAK, NIK, IKK o p38), inhibidores de enzima convertora de IL-1 β (por ejemplo, Vx740), anti-P7s, ligando de glicoproteína p-selectina (PSGL), inhibidores de enzima convertora de $TNF\alpha$, inhibidores de señalización de linfocitos T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima convertora de angiotensina, receptores de citocina solubles y derivados de los mismos (por ejemplo receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor de IL-13 soluble (sIL-13)) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β).

Los ejemplos preferidos de agentes terapéuticos para enfermedad de Crohn en los que un anticuerpo o una parte de unión a antígeno puede combinarse incluyen los siguientes: antagonistas de TNF , por ejemplo anticuerpos anti- TNF ; D2E7, (número de serie de solicitud de Estados Unidos 08/599.226, presentada el 9 de febrero de 1996), cA2 (Remicade™), CDP571, fragmentos de anticuerpo anti- TNF (por ejemplo, CDP870), construcciones de $TNFR-Ig$ (p75TNFR1gG (Enbrel™) y p55TNFR1gG (Lenercept), anti-P7, ligando de glicoproteína p-selectina (PSGL), receptor de IL-13 soluble (sIL-13) e inhibidores de PDE4. Pueden combinarse anticuerpos de la invención o partes de unión a antígeno de los mismos, con corticosteroides, por ejemplo, budenosida y dexametasona. Los anticuerpos de la invención o partes de unión a antígeno de los mismos, también pueden combinarse con agentes tales como sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico y olsalazina, y agentes que interfieren con síntesis o acción de citocinas proinflamatorias tales como IL-1, por ejemplo, inhibidores de enzima convertora de IL-1 β (por ejemplo, Vx740) e IL-1ra. También pueden usarse anticuerpos de la invención o parte de unión a antígeno de los mismos con inhibidores de señalización de linfocitos T, por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa 6-mercaptopurinas. Los anticuerpos de la invención o partes de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse con IL-11.

Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple con los que puede combinarse un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón β 1a (Avonex; Biogen); interferón β 1b (Betaseron; Chiron/Berlex); Copolímero 1 (Cop-1; Copaxona; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; anticuerpos para o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF , LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o partes de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o partes de unión a antígeno de los mismos, también pueden combinarse con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil micofenolato, leflunomida, AINE, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con señalización por citocinas proinflamatorias tales como $TNF\alpha$ o IL-1 (por ejemplo inhibidores de MAP quinasa, IRAK, NIK, IKK o p38), inhibidores de enzima

convertora de IL-1 β (por ejemplo, Vx740), anti-P7s, ligando de glicoproteína p-s selectina (PSGL), inhibidores de TACE, inhibidores de señalización de linfocitos T tales como inhibidores de quinasa inhibidores de metaloproteínasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima convertora de angiotensina, receptores de citocina solubles y derivados de los mismos (por ejemplo receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-IRI, sIL-1RII, sIL-6R, receptor de IL-13 soluble (sIL-13)) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β).

Los ejemplos preferidos de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple en los que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo pueden combinarse incluyen interferón β , por ejemplo, IFN β 1a e IFN β 1b; Copaxona, corticosteroides, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF y anticuerpos para ligando de CD40 y CD80.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o parte de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte de anticuerpo para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que se usa dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse una embolada sencilla, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en formas unitarias de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos para tratar, considerando una cantidad predeterminada de compuesto activo que se ha calculado que produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención se dicta por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular para conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la preparación de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante ejemplar de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención es 0,01-20 mg/kg, más preferiblemente 1-10 mg/kg, aún más preferiblemente 0,3-1 mg/kg. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección para aliviar. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto profesional, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en este documento son ejemplares solamente y no se pretende que limiten el alcance o práctica de la composición reivindicada.

VII. Usos de los anticuerpos de la invención

Dada su capacidad para unirse a hIL-12, los anticuerpos anti-hIL-12, o partes de los mismos, de la invención pueden usarse para detectar hIL-12 *in vitro* (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. La invención proporciona un método para detectar hIL-12 *in vitro* en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención y detectar el anticuerpo (o parte de anticuerpo) unido a hIL-12 o anticuerpo (o parte de anticuerpo) no unido, para detectar de este modo hIL-12 en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina o una vidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umberiferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacililamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Como alternativa a marcar el anticuerpo, hIL-12 puede ensayarse en fluidos biológicos por un inmunoensayo de competición utilizando patrones de rhIL-12 con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-hIL-12 no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de rhIL-12 marcados y el anticuerpo anti-hIL-12 se combinan y se determina la cantidad de patrón de rhIL-12 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de hIL-12 en la

muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de rhIL-12 marcado unido al anticuerpo anti-hIL-12.

Los anticuerpos Y61 y J695 de la invención también pueden usarse para detectar IL-12 de especies distintas de seres humanos, en particular IL-12 de primates. Por ejemplo, puede usarse Y61 para detectar IL-12 en el mono cynomolgus y el mono rhesus. J695 puede usarse para detectar IL-12 en el mono cynomolgus, mono rhesus y babuino. Sin embargo, ninguno de los anticuerpos reacciona de forma cruzada con IL-12 de ratón o de rata (véase Ejemplo 3, subsección F).

Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención son capaces de neutralizar actividad de hIL-12 *in vitro* (véase Ejemplo 3) e *in vivo* (véase Ejemplo 4). En consecuencia, los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención pueden usarse para inhibir la actividad de IL-12 *in vitro*, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene hIL-12.

En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo humano aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que neutraliza la actividad de IL-12 humana, y al menos un IL-12 de primate adicional seleccionada del grupo que consiste en IL-12 de babuino, IL-12 de tití, IL-12 de chimpancé, IL-12 de cynomolgus e IL-12 de rhesus, pero que no neutraliza la actividad de la IL-12 de ratón. Preferiblemente, la IL-12 es IL-12 humana. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene, hIL-12, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención puede añadirse al medio de cultivo para inhibir la actividad de hIL-12 *in vitro* en el cultivo.

En otra realización, el anticuerpo de la invención es útil en un método para inhibir la actividad de IL-12 en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de IL-12 es perjudicial. IL-12 se ha implicado en la patofisiología de una amplia diversidad de trastornos (Windhagen *et al.*, (1995) J. Exp. Med. 182: 1 985-1996; Morita *et al.* (1998) Arthritis and Rheumatism. 41: 306-314; Bucht *et al.*, (1996) Clin. Exp. Immunol. 103: 347-367; Fais *et al.* (1994) J. Interferon Res. 14:235-238; Parronchi *et al.*, (1997) Am. J. Path. 150:8 23-832; Monteleone *et al.*, (1997) Gastroenterology. 112: 1169-1178, y Berrebi *et al.*, (1998) Am. J. Path. 152:667-672; Parronchi *et al.* (1997) Am. J. Path. 150:823-832). El anticuerpo de la invención es útil en métodos para inhibir la actividad de IL-12 en un sujeto que padece un trastorno tal, comprendiendo dicho método administrar al sujeto un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención de modo que la actividad de IL-12 en el sujeto se inhiba. Preferiblemente, la IL-12 es IL-12 humana y el sujeto es el sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que exprese una IL-12 con la que reacciona de forma cruzada un anticuerpo de la invención. Además el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido hIL-12 (por ejemplo, por administración de hIL-12 o por expresión de un transgén de hIL-12). Puede administrarse un anticuerpo de la invención a un sujeto humano para fines terapéuticos (analizado adicionalmente posteriormente). Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que exprese una IL-12 con la que el anticuerpo reacciona de forma cruzada para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto al último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosis y ciclos temporales de administración).

Como se usa en este documento, la frase “un trastorno en el que la actividad de IL-12 es perjudicial” pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que se ha mostrado que la presencia de IL-12 en un sujeto que padece el trastorno es o se sospecha que es responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. En consecuencia, un trastorno en el que la actividad de IL-12 es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de IL-12 alivie los síntomas y/o progresión del trastorno. Tales trastornos pueden manifestarse, por ejemplo, mediante un aumento en la concentración de IL-12 en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de IL-12 en suero, plasma, fluido sinovial, etc. del sujeto), que puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-IL-12 como se ha descrito anteriormente. Existen numerosos ejemplos de trastornos en los que la actividad de IL-12 es perjudicial. En una realización, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse en terapia para tratar las enfermedades o trastornos descritos en este documento. En otra realización, los anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse para la fabricación de una medicina para tratar las enfermedades o trastornos descritos en este documento. El uso de los anticuerpos y partes de anticuerpo de la invención en el tratamiento de uno o pocos trastornos específicos no limita adicionalmente posteriormente:

A. Artritis reumatoide:

Se ha implicado la interleucina 12 en el desempeño de un papel en enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide. Se ha detectado mensaje de IL-12p40 inducible en sinovios de pacientes con artritis reumatoide y se ha mostrado que IL-12 está presente en los fluidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide (véase por ejemplo, Morita *et al.*, (1998) Arthritis and Rheumatism 41: 306-314). Se ha descubierto que están presentes células positivas para IL-12 en la capa de subvestimiento del sinovio de artritis reumatoide. Los anticuerpos humanos, y partes de anticuerpo de la invención, pueden usarse para tratar, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis de Lyme, espondilitis reumatoide, osteoartritis y artritis gotosa. Típicamente, el anticuerpo, o parte de anticuerpo, se administra por vía sistémica, aunque para ciertos trastornos, puede ser beneficiosa la administración local del anticuerpo o parte de anticuerpo. Un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la invención también puede

administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

En el modelo murino de artritis inducida por colágeno (CIA) para artritis reumatoide, el tratamiento de ratones con un mAb anti-IL-12 (anticuerpo monoclonal de IL-12 anti-ratón de rata, C17.15) antes de artritis suprimió en gran medida la aparición y redujo la incidencia y gravedad de la enfermedad. El tratamiento con el mAb anti-IL-12 temprano después de la aparición de artritis redujo la gravedad, pero el tratamiento posterior de los ratones con el mAb anti-IL-12 después de la aparición de enfermedad tuvo un efecto mínimo en la gravedad de la enfermedad.

B. Enfermedad de Crohn

La interleucina 12 también desempeña un papel en la enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn. Se produce expresión aumentada de IFN- γ e IL-12 en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn (véase por ejemplo, Fais *et al.*, (1994) J. Interferon Res. 14: 235-238; Parronchi *et al.*, (1997) Amer. J. Pathol. 150: 823-832; Monteleone *et al.*, (1997) Gastroenterology 112: 1169-1178; Berrebi *et al.*, (1998) Amer. J. Pathol. 152: 667-672). Se ha mostrado que los anticuerpos anti-IL-12 suprimen la enfermedad en modelos de ratón de colitis, por ejemplo, ratones knockout para IL-2 con colitis inducida por TNBS, y recientemente en ratones knockout para IL-10. En consecuencia, los anticuerpos, y partes de anticuerpo, de la invención, pueden usarse en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino.

C. Esclerosis múltiple

Se ha implicado la interleucina 12 como un mediador clave de esclerosis múltiple. La expresión del mensaje de p40 de IL-12 inducible o IL-12 en sí mismo puede demostrarse en lesiones de pacientes con esclerosis múltiple (Windhagen *et al.*, (1995) J. Exp. Med. 182: 1985-1996; Drulovic *et al.*, (1997) J. Neurol. Sci. 147: 145-150). Los pacientes progresivos crónicos con esclerosis múltiple tienen niveles en circulación elevados de IL-12. Las investigaciones con linfocitos T y células presentadoras de antígenos (APC) de pacientes con esclerosis múltiple reveló una serie que se autoperpetúa de interacciones inmunes como la base de esclerosis múltiple progresiva que conduce a respuesta inmune de tipo Th1. La secreción aumentada de IFN- γ de los linfocitos T condujo a producción aumentada de IL-12 por APC, que perpetuó el ciclo que conduce a un estado crónico de una activación inmune de tipo Th1 y enfermedad (Balashov *et al.*, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 599-603). El papel de IL-12 en esclerosis múltiple se ha investigado usando modelos de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) de ratón y de rata de esclerosis múltiple. En un modelo de EAE de recaída-remisión de esclerosis múltiple en ratones, el pretratamiento con mAb anti-IL-12 retardó la parálisis y redujo las puntuaciones clínicas. El tratamiento con mAb anti-IL-12 en el pico de parálisis o durante el periodo de remisión posterior redujo las puntuaciones clínicas. En consecuencia, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden servir para aliviar síntomas asociados con esclerosis múltiple en seres humanos.

D. Diabetes Mellitus insulino dependiente

Se ha implicado la interleucina 12 como un mediador importante de diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM). Se indujo IDDM en ratones NOD mediante administración de IL-12, y los anticuerpos anti-IL-12 fueron protectores en un modelo de transferencia adoptiva de IDDM. Los pacientes con IDDM de aparición temprana con frecuencia experimentan un denominado "periodo de luna de miel" durante el que se mantiene algo de función de las células de islotes residuales. Estas células de islotes residuales producen insulina y regulan los niveles de glucosa en sangre mejor que la insulina administrada. El tratamiento de estos pacientes de aparición temprana con un anticuerpo anti-IL-12 puede evitar destrucción adicional de células de islotes, manteniendo de este modo una fuente endógena de insulina.

E. Psoriasis

Se ha implicado la interleucina 12 como un mediador clave en psoriasis. La psoriasis implica lesiones cutáneas agudas y crónicas que se asocian con un perfil de expresión de citocinas de tipo TH1 (Hamid *et al.* (1996) J. Allergy Clin. Immunol. 1: 225-231; Turka *et al.* (1995) Mol. Med. 1: 690-699). Se detectaron ARNm de p35 y p40 de IL-12 en muestras de piel humana enferma. En consecuencia, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden servir para aliviar trastornos cutáneos crónicos tales como psoriasis.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de línea germinal de familia VH3. Numeración de acuerdo con Kabat (VH de Joe9 incluida para comparación)

[illegible]

5

Tabla 1 Secuencias de aminoácidos de línea germinal de familia VH3
Numeración de acuerdo con Kabat
(VH de Joe9 incluida para comparación)

SEC ID Nº:	VH de línea germin al	CDR <u>H1</u>	CDR <u>H2</u>
640	B1	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
641	B1J	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
642	B1B	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
643	B26	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
644	B28E	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
645	B29E	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
646	B29N	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
647	B30	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
648	B32M	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
649	cos-3	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
650	dp-49	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
651	dp-50	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
652	p6	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
653	p9E	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
654	v3-30	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
655	v3-33	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
656	dp-51	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
657	dp-52	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN
658	H8C4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYSNH
659	v3-22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYSNH
660	v3-46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYSNH
661	DP-52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYSNH
662	cos-6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYVHL
663	dp-53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYNMH
664	dp-54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYNMH
665	dp-87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYNMH
666	VHJ-13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	SYNHS
667	JOE9 VH	QVQLVQSGGGVQPGKSLRLSCAASGFTT	SYGHN

Tabla 1 Secuencias de aminoácidos de línea germinal de familia Vλ1
Numeración de acuerdo con Kabat.
(VL de Joe9 incluida para comparación)

SEC ID	Gen *	VL	CDR H1	CDR H2	CDR	L3	
Nº:							
668	1b	DPL5	QSVLTQPPSV3AAPGQKVTI	NYQLPGTAPKLLI	ONNKRP	GVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQDEAD	GTNDSSLQA
669	1d	DPL4	QSVLTQPPSV3AAPGQKVTI	NYQLPGTAPKLLI	ENNKRP	GVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQDEAD	LANDTSPNA
670	1c	DPL2	QSVLTQPPSV3AAPGQKVTI	NYQLPGTAPKLLI	ENNKRP	GVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQDEAD	AAWDDSLNG
671	1g	DPL3	QSVLTQPPSV3AAPGQKVTI	NYQLPGTAPKLLI	ENNKRP	GVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQDEAD	AAWDDSLNG
672	1a	DPL1	QSVLTQPPSV3AAPGQKVTI	NYQLPGTAPKLLI	ENNKRP	GVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQDEAD	AAWDDSLNG
673	1f	DPL9	QSVLTQPPSV3AAPGQKVTI	NYQLPGTAPKLLI	ENNKRP	GVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQDEAD	AAWDDSLNG
674	1e	DPL8	QSVLTQPPSV3AAPGQKVTI	NYQLPGTAPKLLI	ENNKRP	GVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQDEAD	AAWDDSLNG
675		JOE9 VL	QSVLTQPPSV3AAPGQKVTI	NYQLPGTAPKLLI	ENNKRP	GVPDRFSGSKSGTSATLGITGLQDEAD	AAWDDSLNG

Williams, JMB, 1996, 264, 220-232

Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
Joe9 wt	77	SGSYDY	110	QSYDSSLRGSRV	1,00E-01	1,50E-06	1,00E-06	
Joe9 wt IgGI	77	SGSYDY	110	QSYDSSLRGSRV			5,00E-07	
70-1	78	HGSHDN	110	Joe9 wt	1,34 e-2		2,00E-07	
70-1 IgGI	78	HGSHDN	110	Joe9 wt			2,00E-07	
70-2	79	HGSDYD	110	Joe9 wt	3,30E-02		3-5,0E-7	
70-7	80	RRRSNY	110	Joe9 wt	1,29E-01		3-5,0E-7	
70-13	81	SGSIDY	110	Joe9 wt	7,20E-02		3-5,0E-7	
78-34	77	wt	111	QSYDRGFTGSRV	1,64 e-2	2,00E-07	6,00E-07	
78-25	77	wt	112	QSYDSSLRGSRV	5,00E-02			
78-28	77	wt	112	QSYDSSLRGSRV	4,66E-02			
78-35	77	wt	113	QSYDSSLTGSRV	4,99E-02	4,00E-07		
79-1	77	wt	114	QSYDSSLWGSRV		2,00E-07	6,00E-07	
101-14	79	70-2	111	78-34	1,52E-03			
101-9	79	70-2	113	78-35	8,54E-03			
101-19	81	70-13	111	78-34	4,56E-02			
101-8	81	70-13	111	78-34	1,01 E-02			
101-4	81	70-13	113	78-35	9,76E-03			
101-5	81	70-13	113	78-35	4,45 E-02			
101-11 (12)	78	70-1	111	78-34	4,5 e-3		3,00E-08	
101-11 IgG1	78	70-1	111	78-34		1,60E-09		
26-1 (2,3)	78	70-1	114	79-1	7,4 e-3		6,00E-08	
136-9	82	HGSHDD	115	QTYDISEGSRV	3,20E-03			
136-10	82	HGSHDD	116	QSYDRGFTGSRV	1,40E-03	2,00E-09		
136-14	83	HGSHDN	117	QTYDRGFTGSRV	1,10E-03	3,00E-10	1,00E-07	
136-15	83	HGSHDN	118	QTYDKGFTGSSV	7,4 e-4	1,00E-10	2,00E-09	
136-15 línea germinal	83	HGSHDN	118	QTYDKGFTGSSV	4,60E-04		6,00E-09	
136-16	83	HGSHDN	119	QSYDRRFTGSRV	6,10E-04	3,00E-10	5,00E-09	
136-17	83	HGSHDN	120	QSYDWNFTGSRV	2,90E-05	2,00E-09	7,00E-09	
136-18	83	HGSHDN	121	QSYDRGFTGSRV	1,10E-03	8,00E-10		
136-21	83	HGSHDN	122	QSYDNGFTGSRV	4,20E-04	2,00E-09		
136-24	83	HGSHDN	123	QSYDNAVTASKV	8,90E-04	1,00E-09		
Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
101-11	84	HGSHDN WGOG	124	QSYDRGFTGSRV	4,5x10-3	2X10-9	2,00E-08	
136-15M1	85	AK	124	QSYDRGFTGSRV		4, 00E-10		

Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
103-6			131	D...T..	4,5x10-4			
103-7	98	D	131	D...T..	3,7x10-4	1,40E-10	1,00E-09	
103-8	99	K.....	130	T.K.....S.	3,3x10-4	6,00E-11	1,50E-09	
103-14 & 9	100	KTHGSHDN	132	QSYDRGFTGSMV	6,7 e-4	4-00E-11	1,20E-09	
103-8&2	100	KTHGSHDN	133	QTYDKGFTGSSV	5,3 e-4		1,50E-09	
103-4	101	TTHGSHDN	134	QSYDRGFTGARV	1,6 e-4	8,60E-11	9-00E-10	
103-152	101	TTHGSHDN	135	QSYERGFTGARV		8,60E-11		
	102	TT SGSYDY	136	ORYDRGFTGSRYE				
170-1	102		137	FK..	2,35E-03			
170-2	102		138	VSAY..	8,80E-04			
170-3	102		139	L.VTK..	1,11E-03			
170-4	102		140	Y.A....	8,11E-04			
170-7	102		141	K..	5,30E-04			
170-11	102		142	L.F....	4,40E-04			
170-13	102		143	YK..	1,59E-03			
170-15	102		144	L.Y.L	4,43 E-03			
170-19	103	..H..H.N	145	DYK..	1,00E-03			
170-21	104	..H..Q.N	146	P.L..	3,89E-03			
170-22	102		147	L...	5,60E-04			
170-23	103	..H..H.N	148	A..W	1,00E-03	2,00E-10		
170-24	109	..H..Q.N	149	Y...	2,80E-04	5,00E-10		
170-35	105	A. H..Q.N	136		1,00E-05			
170-38			150	P...	2,10E-04			
170-39			151	M.S....	2,79E-03			
170-36	83	HGSHDN	152	QSYDRDSTGSRVF	4,00E-04	2,00E-10		
170-25	106	HGSQDT	153	QSYDSSLRGSRVF	5,00E-04	5,00E-11		
Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
	106	SGSYDY	136	OSYDRGFTGSRVF				
73-B1	107	SGSYDY	154	H...SD	3,25E-03	>1E-8		
73-B2	107	SGSYDY	155	H.SES	2,07E-03			
73-B6	107	SGSYDY	156	H...NR	2,51 E-03	>1E-8		
73-C1	107	SGSYDY	157	H...SR.....	2,71 E-03	>1E-8		
73-C2	107	SGSYDY	158	SE.....	3,79E-03			
73-C6	107	SGSYDY	159	...T.....	3,96E-03			
73-D1	107	SGSYDY	160	H...S	3,99E-03			
73-D2	107	SGSYDY	161	T	3,56E-03			

Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
73-D4	107	SGSYDY	162	H...TK.....	5,36E-03			
73-D5	107	SGSYDY	163	H.S.S.....	3,57E-03			
73- E3	107	SGSYDY	164	SD	4,98E-03			
73-E6	107	SGSYDY	165	H..ES.....	4,17E-03			
73-F3	107	SGSYDY	166	APWS.....	7,08E-03			
73-F5	107	SGSYDY	167	...DSD....K..	3,74E-03			
73-G2	107	SGSYDY	168	HTN.S.....	3,98E-03			
73-G3	107	SGSYDY	169	H...TR.....	3,50E-03			
73-G4	107	SGSYDY	170	MR.....	6,58E-03			
73-G5	107	SGSYDY	171	H.S.SDS.....	6,01 E-03			
73-G6	107	SGSYDY	172	...NTD.....	6,30E-03			
73-H2	107	SGSYDY	173	S.....	5,93E-03			
73- F6	107	SGSYDY	174	H...M.....	5,87E-03			
73-H3	107	SGSYDY	175	H...N.....	6,85E-03			
73-C5	107	SGSYDY	176	H.H..D.....	4,84E-03			
73-B7	108	HGSQDN	177	QSYDSSLRGSRV	2,50E-03	7,00E-09		

Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
M2 A2	83	HGSHDN	136	<u>OSYDR</u> CFTGSRVF 178.....IH.....	4,00E-02			
M2 A4	83	HGSHDN	179	S.P.....	8,49E-03			
M2 A5	83	HGSHDN	180	I.S.....	4,01 E-02			
M2 B1	83	HGSHDN	181	S.L.....	7,97E-03			
M2 B3	83	HGSHDN	182	I.M.....	4,60E-02			
M2 B4	83	HGSHDN	183	I.L.....	4,42 E-02			
H2 B5	83	HGSHDN	184	S.V.....	8,38E-03			
M2 B6	83	HGSHDN	185	LA.....	2,81 E-02			
M2 C2	83	HGSHDN	181	S.L.....	4,85E-02			
M2 C3	83	HGSHDN	186	T.L.....	4,62E-02			
M2 C4	83	HGSHDN	181	S.L.....	8,16E-03			
M2 C5	83	HGSHDN	187	...TAL.....	4,71 E-02			
M2 D1	83	HGSHDN	188	IR.....	3,71 E-02			
M2 D2	83	HGSHDN	189	IRS.....	3,85E-02			
M2 D3	83	HGSHDN	190	NRL.....	3,33E-02			
M2 D4	83	HGSHDN	191	...ETS.....	5,81 E-02			
H2 D5	83	HGSHDN	192	SSS.....	5,18E-02			

Tabla 2

Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
M2 D6	83	HGSHDN	193	S...A....	5,01 E-02			
M2 E1	83	HGSHDN	194	T.K.....S..	5,32E-02			
M2 E2	83	HGSHDN	195	N.....	4,77E-02			
M2 E6	83	HGSHDN	196	...T..K....	9,77E-03			
M2 F1	83	HGSHDN	197	SDV	6,16E-02			
M2 H5	83	HGSHDN	198	A.....	9,90E-03			

Tabla 2

Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
A5	83	HGSHDN	124	OSYDRGFTGSR				
A12	83	HGSHDN	199	THPSML	1,12E-03			
A4	83	HGSHDN	200	TTPRPM	1,43E-03			
A6	83	HGSHDN	201	RNPALT	1,47E-03			
A10	83	HGSHDN	202	THPWLH	1,87E-03			
A11	83	HGSHDN	203	NSPATV	1,87E-03			
C2	83	HGSHDN	204	TFPSPQ	2,07E-03			
A8	83	HGSHDN	205	LNPSAT	2,23E-03			
B8	83	HGSHDN	206	KSNKML	2,37E-03			
C6	83	HGSHDN	207	HTAHLY	2,40E-03			
A3	83	HGSHDN	208	QTPSIT	2,42E-03			
B11	83	HGSHDN	209	YPRNIL	2,51 E-03			
B5	83	HGSHDN	210	ITPGLA	2,95E-03			
C10	83	HGSHDN	211	QPHAVL	3,04E-03			
C4	83	HGSHDN	212	NSPIPT	3,10E-03			
C3	83	HGSHDN	213	TPNNSF	3,23E-03			
B2	83	HGSHDN	214	S.VDPGPY	3,34E-03			
A2	83	HGSHDN	215	RPRHAL	3,61 E-03			
C5	83	HGSHDN	216	PYHPIR	3,80E-03			
A7	83	HGSHDN	217	PHTQPT	3,91 E-03			
C9	83	HGSHDN	218	HNNFSP	3,95E-03			
83	83	HGSHDN	219	PTHLP	3,97E-03			
C8	83	HGSHDN	220	TPSYPT	4,12E-03			
B7	83	HGSHDN	221	S.TSNLLP	5,36E-03			
A1	83	HGSHDN	222	DSNHDL	5,45E-03			
C7	83	HGSHDN	223	LPRLTH	5,66E-03			
C12	83	HGSHDN	224	IPTSYL	5,83E-03			
B10	83	HGSHDN	225	LRVQAP	5,85E-03			
			226	LSDSPL	6,04E-03			

Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
B6	83	HGSHDN	227	S.SLRIL	7,58E-03			
A9	83	HGSHDN	228	PARTSP	7,98E-03			
B9	83	HGSHDN	229	RAAHPQ	8,66E-03			
Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
177-D7	83	HGSHDN	124	<u>OSYDRGETGSRY</u>				
177-G6	83	HGSHDN	230	TQPASI	4,07E-04			
177-D9	83	HGSHDN	231	THPTMI	5,50E-04			
177-D9	83	HGSHDN	232	RIPABT	6,32E-04			
177-C6	83	HGSHDN	233	THPVPA	7,94E-04			
177-H5	83	HGSHDN	234	SBPIPA	1,32E-03			
177-H9	83	HGSHDN	235	THPVPA	1,58E-03			
177-H10	83	HGSHDN	236	THPTMY	3,44E-01			
144-F1	83	HGSHDN	237	HHYTFE	5,80E-04			
43- E3	83	HGSHDN	238	SHPAAE	8,00E-04			
43-E9	83	HGSHDN	239	TIPSIE	B-00E-04			
43-G2	83	HGSHDN	240	SSPAIM	7,00E-04			
43-G3	83	HGSHDN	241	IWPNLN	9,00E-04			
31-A6	83	HGSHDN	242	THPNLN	5,00E-04			
31-B5	83	HGSHDN	243	THPSIS	5,00E-04			
ORYDRGFTGSEV								
Y17	83	HGSHDN	124	QSYDRGSAPMIN	8,90E-05	4,50E-10	>1E-8	
Y19	83	HGSHDN	244	QSYDRGHHPAMS	2,26E-04	3,00E-11	>1E-8	
Y38	83	HGSHDN	245	THPSIT	5,08E-04	5,50E-11	2,60E-09	
Y45	83	HGSHDN	246	TDPAIV	6,17E-04	4,00E-11	4,30E-09	
Y61	83	HGSHDN	247	THRALL	2,75 e-4	4E-11		
Y61 IgG	83	HGSHDN	248	THPALL	1,50E-04	1,60E-11	1,40E-10 1,30E-10	
Y61 IgG línea germinal	83	HGSHDN	248	THPALL	1,50E-04	1,60E-11	1,30E-10	
Y139	83	HGSHDN	249	SHPALT	5,92E-04	3E-11	4,50E-10	1,60E-10
Y139 IgGl	83	HGSHDN	249	SHPALT			1,00E-09	
Y174	83	HGSHDN	250	TTPAPE	7,55E-04	6E-11	2,00E-09	
Y177	83	HGSHDN	251	SHPTLI	6,61 E-04	5E-11	1,00E-09	
A5	83	HGSHDN	252	THPSML	4,50E-04	6,60E-11		
A12	83	HGSHDN	253	TTPRPM	5,57E-04	2,50E-10		
D9	83	HGSHDN	254	RLPAQT	8,21 E-04	3,5E-09	»	

Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
G6	83	HGSHDN	255	THPLTI	5,08E-04	1E-10	1,00E-09	
G6 IgG1	83	HGSHDN	255	THPLTI			1,00E-09	
G6	83	HGSHDN	256	QSYDRGQTSPIT	1,07E-03	3,5E-10	1,00E-08	
Y55	83	HGSHDN	257	QSYDRGTHFQMY	1,06E-03	1,40E-10	>1E-8	
Tabla 2								
A4	83	HGSHDN	258	QSYDRGRNPALT	6,30E-04	2,50E-10		
A03	83	HGSHDN	259	QSYDRGTHPLTM	3,04E-04	3,00E-11	4,00E-10	
A03 IgG1	83	HGSHDN	260	QSYDRGTHPLTH	3,04 e-4	2,90E-11	3,80E-10	
A03 IgG línea germinal	83	HGSHDN	260	QSYDRGTHPLTM	2,50E-04	3,50E-11	1,75E-10	
99-B11	83	HGSHDN	261	QSYDSGYTGSRV	5,40E-03			
99-C11	83	HGSHDN	262	QSYDSGFTGSRV	5,70E-03			
99-H4	83	HGSHDN	263	QSYDSRFTGSRV	4,80E-03			
99-E9	83	HGSHDN	262	QSYDSGFTGSRV	5,40E-03			
99-H7	83	HGSHDN	264	QSYDPDGPASRV	3,30E-03,			
99-H11	83	HGSHDN	265	QSYSTHMPISRV	4,90E-03			
99-F6	83	HGSHDN	266	QSYDSGSTGSRV	4,90E-03			
99-F7	83	HGSHDN	267	QSYPNSYPISRV	4,80E-03			
99-F8	83	HGSHDN	268	QSYIRAPQQV	3,70E-03			
99-F11	83	HGSHDN	262	QSYDSGFTGSRV	5,40E-03			
99-G7	83	HGSHDN	269	QSYLKSRAFSRV	4,80E-03			
99-G11	83	HGSHDN	270	QSYDSRFTGSRV	4,30E-03			
			124	<u>QSYDRGFTGSRV</u>				
L3.3R3M-B1	83	HGSHDN	271	FTGSMV	5,46E+00			
L3.3R3M-B3	83	HGSHDN	272	FTGSMV	5,51 E+00			
L3.3R3M-C6	83	HGSHDN	273	 FTGFDG	6,17E+00			
L3.3R3M-F9	83	HGSHDN	274	TAPALS	4,99E+00			
L3.3R3M-G8	83	HGSHDN	275	SYPALR	5,55E+00			
L3.3R3M-H6	83	HGSHDN	276	NWPNSN	5,69E+00			
L3.3R3M-H10	83	HGSHDN	277	TAPSL	5,35E+00			
L3.3R3M-A3	83	HGSHDN	278	FTGSMV	5,37E+00			
L3.3R3M-F8	83	HGSHDN	279	TTPRIR	4,99E+00			
L3.3R3M-G1	83	HGSHDN	280	FTGSMV	4,21 E+00			
L3.3R3M-G7	83	HGSHDN	281	FTGSMV	4,24E+00			
L3.3R3M-H11	83	HGSHDN	282	MIPALT	3,95E+00			

Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
Tabla 2								
Clon	H3 SEC ID N°:	H3	L3 SEC ID N°:	L3	koff	CI50 de ensayo RB (M)	CI50 de ensayo PHA (M)	CI50 de IFN gamma (M)
Y61-L94N	109	CKT HGSHDN	283	QSYDRNTHPALL			8,00E-11	
Y61-L94F	109	CKT HGSHDN	284	QSYDRFTHPALL			6,00E-11	
Y61-L94Y	109	CKT HGSHDN	285	QSYDRYTHPALL		2,00E-11	2,00E-11	
Y61-L94Y IgG	109	CKT HGSHDN	285	QSYDRYTHPALL	1,27E-04	6,00E-11	5,00E-11	4-00E-11
Y61-L50Y	109	CKT HGSHDN	286	QSYDRGTHPALL		2-00E-11		2,00E-11
Y61-L50Y* IgG	109	CKT HGSHDN	286	QSYDRGTHPALL	6,98E-05		2,00E-11	3,00E-11
Y61-L50Y-H31 E** IgG	109	CKT HGSHDN	286	QSYDRGTHPALL	2,99E-05		6,00E-11	2,00E-11
Y61-L50Y-H31 E-L94Y** IgG	109	CKT HGSHDN	287	QSYDRYTHPALL	4,64E-05		1-00E-11	1,00E-11
J 695 (Y61-L94Y- L50Y IgG*)	109	CKT HGSHDN	287	QSYDRYTHPALL	5,14E-05	5,00E-11	1,00E-11	5,00E-12
*CDR L2: L50G a Y								
**CDR L2: L50G a Y; CDRH1: H31S a E								

Tabla 3																																	
Número de Kabat	CDR H1					CDR H2										CDR H3																	
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95	96	97	101	102			
Y61 VH	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	F	I	R	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	H	G	S	H	D	N	
Posiciones de contacto			x	x	x	x		x		x	x	x	x	x	x		x	x									x	x	x	x	x		
Posiciones de hipermutación			x	x	x					x						x	x																
Número de Kabat	CDR L1					CDR L2					CDR L3																						
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95A	95B	95C	96	97	
Y61 VL	S	G	G	R	S	N	I	G	S	N	T	V	K	G	N	D	Q	R	P	S	Q	S	Y	D	R	G	T	H	P	A	L	L	
Posiciones de contacto										x	x	x	x		x	x	x	x															
Posiciones de hipermutación										x	x	x			x																		
x posición de contacto y/o hipermutación x posición de contacto y/o hipermutación mutada en Y61																																	

Tabla 4 Actividad de Neutralización en Presencia de p40 de IL-12 Libre en Exceso				
SEC ID N°:	Clon	CI50 de ensayo de PHA (M) p70: p40 1:0	CI50 de ensayo de PHA (M) p70: p40 1:20	CI50 de ensayo de PHA (M) p70: p40 1:50
VH:47	136-15	2,00E-09	5,00E-09	4,00E-09
VL48				
VH:51	149-5	6,50E-09	7,00E-09	4,00E-09
VL:52				
VH:53	149-6	9,00E-10	1,00E-09	1,00E-09
VL:54				
VH:84	149-7	3,50E-09	2,50E-09	4,00E-09
VL: 126				
VH:23	Y61 IgG	1,80E-10		1,80E-10
VL24				
VH:65	A03 IgG1	2,50E-10		2,20E-10
VL66				
VH:31	J695	1,00E-11		3,50E-11
VL32				

Ejemplos

5

Los anticuerpos descritos en los ejemplos son parte de la invención en la medida de que cumplan los requisitos de la reivindicación adjunta 1.

Ejemplo 1: Aislamiento de anticuerpos anti-IL-12

10

A. Exploración para anticuerpos que se unen a IL-12

Se aislaron anticuerpos para IL-12 mediante exploración de tres bibliotecas de presentación de fagos de scFv separadas preparadas usando ADNc de VL y VH humanas de ARNm derivado de amígdalas humanas (denominado scFv 1), linfocitos de sangre periférica y de amígdalas (PBL) (denominado scFv 2), y linfocitos derivados de médula ósea (denominados BMDL). Se describen construcción de la biblioteca y métodos para selección en Vaughan *et al.* (1996) Nature Biotech. 14: 309-314.

15

Las bibliotecas se exploraron usando los antígenos, subunidad p70 de IL-12 humana, subunidad p40 de IL-12 humana, IL-12 quimérica (p40 de ratón/p35 humana), IL-12 de ratón, IL-12 humana biotinilada e IL-12 quimérica biotinilada. Se seleccionaron anticuerpos específicos de IL-12 usando un antígeno para reclutar inmunotubos usando procedimientos convencionales (Marks *et al.*, (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597). La biblioteca de scFv 2 se exploró usando IL-12, o IL-12 biotinilada, y se generó un número significativo de agentes de unión específicos de IL-12. Se seleccionaron cinco clonotipos diferentes, determinados por patrones de digestión enzimática de BstN1, y se

20

confirmaron por secuenciación de ADN. Los principales clonotipos fueron VHD P58/VLDPL11, VHD P77NLDPK31, VHDP47NL y VHDP77NLDPK31, todos los cuales reconocieron la subunidad p40 de IL-12.

La exploración de la biblioteca de BMDL con p70 de IL-12 generó 3 clonotipos diferentes. Se descubrió que dos de estos eran clones con reactividad cruzada. El clon dominante se secuenció y consistía en VHDP35NLDP. Este clon reconoce la subunidad p40 de IL-12. La exploración de la biblioteca de scFv 1, usando p70 de IL-12, no produjo anticuerpos de IL-12 específicos.

Para identificar anticuerpos de IL-12 que se unan preferentemente al heterodímero p70 o la subunidad p35 de IL-12, en lugar de la subunidad p40, se usaron la biblioteca de scFv 1 + 2 combinada, y la biblioteca de BMDL. Para seleccionar anticuerpos de IL-12 que reconocieran el heterodímero p70 o la subunidad p35, se preincubaron bibliotecas de fagos y se seleccionaron en presencia de p40 libre. La secuenciación de clones aislados reveló 9 linajes de anticuerpos diferentes. Las preferencias de subunidades se analizaron adicionalmente por valoración "micro Friguet". El sobrenadante que contenía scFv se valoró en IL-12 capturada en biotina en un ELISA y se determinó la DE₅₀. La concentración de scFv que producía 50% de DE se preincubó con concentraciones crecientes de p70 o p40 libres (inhibidores). Se midió una reducción de la señal de ELISA en placas recubiertas con biotina-IL-12 y se representó frente a la concentración de p70 o p40 libre. Esto proporcionó a la CI₅₀ para cada clon con respecto a p70 y p40. Si las valoraciones para ambas subunidades se solapan, entonces el scFv se une tanto a p40 como a p70. Cualquier variación de esto proporciona el grado de preferencia de p70 frente a p40.

B. Maduración de afinidad de linaje de anticuerpo específico para IL-12 (Joe9)

Los clones se ensayaron con respecto a su capacidad para inhibir unión de IL-12 con su receptor en un ensayo de unión con receptor de IL-12 (denominado RBA), y con respecto a su capacidad para inhibir proliferación inducida por IL-12 de blastocitos humanos estimulados por PHA (ensayo de PHA), descrito en el Ejemplo 3. El clon Joe9 tuvo el valor de CI₅₀ más bajo tanto en el ensayo de RBA como en el de PHA, con un valor de CI₅₀ de 1×10^{-6} M en ambos ensayos. Además la regulación variable de cadena pesada (VH) de Joe9 tuvo el menor número de cambios en comparación con la secuencia de línea germinal más cercana COS-3, identificada de la base de datos VBASE. La tabla 1 (véase Apéndice A) muestra la familia V_H3 de secuencias de línea germinal, de las que COS-3 es un miembro, así como miembros de la familia V_H1 de secuencias de línea germinal. Por lo tanto, Joe9 se seleccionó con respecto a maduración de afinidad. Las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo de tipo silvestre Joe9 (Joe9 wt) se muestran en la Figura 1A-1D.

Para aumentar la afinidad de Joe9, se realizaron diversas mutaciones de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de las cadenas tanto pesadas como ligeras. Las variantes de CDR3 se crearon por mutagénesis de PCR dirigida usando oligonucleótidos degenerados específicos para la CDR3 de cadena pesada (denominada "H3") o la CDR3 de cadena ligera (denominada "L3"), con una media de tres sustituciones de bases en cada CDR3 (denominada "adición"). Se realizó mutagénesis por PCR de la CDR3 de cadena pesada usando el oligonucleótido de cadena pesada de generado que contenía una mezcla al eatoria de los cuatro nucleótidos, 5'TGTCCCTTGGCCCCA(G)(T)(A)(G)(T)(C)(A)(T)(A)(G)(C)(T)(C)(C)(A)(C)(T) GGTCGTA-CAGTAATA 3' (SEC ID N°: 580), y oligonucleótido Marcador Inverso de pUC GAC ACC TCG ATC AGC GGA TAA CAA TTTCAC ACA GG (SEC ID N°: 581) para generar un repertorio de mutantes de CDR3 de cadena pesada. La cadena ligera parental se amplificó usando el oligonucleótido inverso de Joe9 (5'TGG GGC CAA GGG ACA3' (SEC ID N°:582)) y el oligonucleótido fdteteseq 24+21 (5'-ATT CGT CCT ATA CCG TTC TAC TTT GTC GTC TTT CCA GAC G TT AGT-3'(SEC ID N°: 583)).

Se usó la complementariedad entre los dos productos de PCR para conducir la hibridación de los dos fragmentos en una reacción de ensamblaje de PCR y se amplificó la biblioteca de scFv recombinada de longitud completa con Marcador Inverso de pUC (SEC ID N°: 581) y Marcador fd 5'-ATT CGT CCT ATA CCG TTC-3' (SEC ID N°: 584). Se realizó mutagénesis por PCR de la cadena ligera usando el oligonucleótido de cadena ligera que contenía una mezcla de los cuatro nucleótidos 5'GGT CCCAGTCCGAAGACCCTC-GAACC(C)(C)(T)(C)(A)(G)(C)(T)(G)(C)(T)(G)(T)(C)ATATGACTGGCAGTAATAGTCAGC3' (SEC ID N°: 585), y oligonucleótido inverso Joe9 5'TGG GGC CAA GGG ACA3'(SEC ID N°: 586) para producir un repertorio de mutantes de CDR3 de cadena ligera. La cadena pesada parental se amplificó con Marcador Inverso de pUC (SEC ID N°: 581) y oligonucleótido HuJH3DIR 5'TGAAGAGACGGTGACCATTTGTCCTT3' (SEC ID N°: 587). La complementariedad entre los dos productos de PCR se usó para conducir la hibridación de los dos fragmentos en una región de ensamblaje por PCR y la biblioteca de scFv recombinada de longitud completa se amplificó con Marcador Inverso GAC ACC TCG ATC AGC G (SEC ID N°: 588) y oligonucleótido HuJL, 2-3DIR NOT 5'GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACC T AG GAC GGT CAG CTT GGT CCC 3' (SEC ID N°: 589).

Se seleccionaron mutantes de CDR3 de cadena pesada usando IL-12 biotinilada 1 nM, y se lavaron durante una hora a temperatura ambiente en PBS que contenía IL-12 o p40 libre a una concentración de 7 nM. Los clones se analizaron por ELISA de fagos y los que se unían a IL-12 se ensayaron en estudios de unión cinética de BIAcore usando una microplaca de IL-12 de baja densidad (véase procedimiento para análisis de BIAcore en el Ejemplo 5). En general, el análisis de BIAcore mide interacciones de unión en tiempo real entre ligando (IL-12 humana recombinante inmovilizada en una matriz biosensora) y analito (anticuerpos en solución) por resonancia de plasmón

superficial (SPR) usando sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). El sistema utiliza las propiedades ópticas de SPR para detectar alteraciones en concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora de dextrano. Las proteínas se unen covalentemente a la matriz de dextrano a concentraciones conocidas. Los anticuerpos se inyectan a través de la matriz de dextrano y la unión específica entre anticuerpos inyectados y ligando inmovilizado da como resultado una concentración de proteínas de matriz aumentada y cambio resultante en la señal de SPR. Estos cambios en la señal de SPR se registran como unidades de resonancia (UR) y se presentan con respecto al tiempo a lo largo del eje y de un sensograma. Para determinar la velocidad de disociación (k_{off}), velocidad de asociación (k_{on}), constantes de velocidad de asociación (K_a) y de velocidad de disociación (K_d), se usó software de evaluación cinética BIAcore (versión 2.1). Los clones que demostraron una mejora en la velocidad k_{off} se analizaron por ensayos de neutralización que incluían inhibición por anticuerpo de unión de IL-12 con su receptor (ensayo de RBA), inhibición de proliferación inducida por IL-12 en blastocitos humanos estimulados por PHA (ensayo de PHA), e inhibición de producción de interferón gamma inducida por IL-12 por blastocitos humanos (ensayo de IFN gamma). Se presenta un sumario de las velocidades de disociación y/o valores de CI_{50} a partir de ensayo de neutralización de clones con adiciones de CDR3 de cadena pesada 70-1 a 70-13 en la Tabla 2 (véase Apéndice A). El clon 70-1 presentó una velocidad k_{off} que era mejor que el clon Joe 9 parental, y tenía el valor de CI_{50} más bajo de $2,0 \times 10^{-7} M$. Por lo tanto el clon 70-1 se seleccionó para conversión a IgG1 completa.

Los mutantes de CDR3 de cadena ligera se seleccionaron usando biotina-IL-12 1 nM y se lavaron con PBS que contenía p40 libre 7 nM. Los clones se exploraron en ELISA de fagos y los que se unieron a IL-12 se ensayaron en análisis de unión de BIAcore usando microplacas de IL-12 de baja densidad. Los clones que presentaron una velocidad de disociación que era mejor que el clon Joe 9 parental se ensayaron en ensayos de neutralización que median inhibición de unión del receptor de IL-12, o inhibición de proliferación de blastocitos de PHA. Se presenta un sumario de las velocidades de disociación y/o valores de CI_{50} a partir de los ensayos de neutralización de clones mutantes de CDR3 de cadena ligera, 78-34 a 79-1, en la Tabla 2 (véase Apéndice A).

Basándose en la velocidad K_{off} , los clones 78-34 y 78-35 presentaron una velocidad k_{off} mejorada en comparación con el Joe 9 parental. Ambos de estos clones se seleccionaron para análisis de combinación con mutantes de cadena pesada.

C. Clones de combinación

Se usaron clones de cadena pesada y ligera mutantes que mostraron las mejores características de unión para combinación y ensamblaje de scFv. Los clones mutantes con características de potencia mejoradas se combinaron por extensión de solapamiento de PCR y arrastre de los segmentos VH y VL mutados como se ha descrito anteriormente. Se produjeron clones 101-14 a 26-1, mostrados en la Tabla 2 (véase Apéndice A), a partir de la combinación de mutantes de CDR3 de cadena pesada (70-2, 70-13 y 70-1) con mutantes de cadena ligera (78-34, 78-35 y 79-1). Las velocidades k_{off} y/o valores de CI_{50} a partir de ensayos de neutralización para estos clones se presentan en la Tabla 2.

El análisis de unión de BIAcore identificó que el clon 101-11, producido a partir de la combinación del clon mutante de CDR3 de cadena pesada 70-1 con el clon mutante de CDR3 de cadena ligera 78-34, tenía una velocidad de disociación de $0,0045 s^{-1}$. Esta velocidad k_{off} fue una mejora significativa en comparación con las velocidades k_{off} para el clon mutante de CDR3 de cadena pesada 70-1 ($0,0134 s^{-1}$), o para el clon mutante de CDR3 de cadena ligera 78-34 ($0,0164 s^{-1}$) solos. Además, el clon 101-11 mostró una mejora significativa en ensayos de neutralización. En consecuencia, el clon 101-11 se seleccionó para maduración de afinidad como se describe posteriormente.

D. Maduración de afinidad del clon 101-11

La maduración de afinidad adicional del clon 101-11 consistió en ciclos de repetición de mutagénesis por PCR de las CDR3 de cadena tanto pesada como ligera de 101-11 usando cebadores oligonucleotídicos con adiciones. Los clones se seleccionaron con concentraciones decrecientes de IL-12 biotinilada (bio-IL-12). Las características de unión de los clones mutados se evaluaron por análisis de unión de BIAcore y ensayos de neutralización de RBA, PHA. Las velocidades k_{off} y/o valores de CI_{50} para clones 136-9 a 170-25 se presentan en la Tabla 2 (véase Apéndice A). El clon 103-14 demostró un valor de CI_{50} mejorado tanto en el ensayo de unión del receptor como en el ensayo de blastos de PHA. El clon 103-14 también demostró una velocidad k_{off} baja, y en consecuencia se seleccionó para maduración de afinidad adicional.

E. Generación y selección de bibliotecas aleatorias de CDR3 ligera de clon 103-14

El CDR3 de cadena ligera de clon 103-14 (QSYDRGFTGSMV (SEC ID N°: 590)) se seleccionó aleatoriamente de forma sistemática en 3 segmentos usando 3 bibliotecas diferentes como se representan posteriormente, en las que X se codifica por un codón aleatorio de secuencia NNS, siendo N cualquier nucleótido y siendo S desoxicitosina o desoxiguanina.

L3.1 = XXXXXXFTGSMV (SEC ID N°: 591)
L3.2 = QSYXXXXXSMV (SEC ID N°: 592)

L3.3 = QSYDRGXXXXXX (SEC ID N°: 593)

Se realizó mutagénesis aleatoria de las tres CDR de cadena ligera (denominadas L3.1, L3.2 y L3.3) del clon 103-14. La CDR3 de cadena pesada (denominada H3) del clon 103-14 no se mutó. Se construyeron cuatro bibliotecas aleatorias basadas en el clon 103-14 (H3 y L3.1, L3.2 y L3.3) y se sometieron a una gran diversidad de condiciones de selección que implicaban usar concentración de antígenos limitante y la presencia o ausencia de antígeno libre en exceso (p40 y p70). Los resultados de selecciones (clones 73-B1 a 99-G11) se exploraron principalmente por BIAcore y en ocasiones con RBA y se muestran en la Tabla 2 (véase Apéndice A).

- 10 La mutagénesis aleatoria de la CDR de cadena ligera de 103-14 generó el clon Y61, que mostró una mejora significativa en valor de CI_{50} en comparación con el clon parental 103-14. Y61 se seleccionó para conversión a una IgG1 completa. La Y61-IgG1 completa tiene un valor de CI_{50} de aproximadamente 130 pM determinado por el ensayo de PHA. El valor de CI_{50} no se vio afectado por un exceso molar de 50 veces de p40 libre, lo que demuestra que p40 libre no reaccionó de forma cruzada con anticuerpo anti-IL-12 Y61 para reducir de este modo la unión de anticuerpo con el heterodímero. La secuencia de longitud completa de región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera de Y61 se muestran posteriormente.

Secuencia peptídica de región variable de cadena pesada de Y61

CDR H1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASFTFS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA

CDR H2

FIRYDGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKT

CDR H3

HGSHDN WGQGTMTVTVSS (SEC ID N°: 23)

- 20 Secuencia peptídica de región variable de cadena ligera de Y61

CDR L1

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC SGGRSNIGSNTVK WYQQLPGTAPKLLIY

CDR L2

GNDQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC

CDR L3

QSYDRGTHPALL FGTGTKVTVLG (SEC ID N°: 24)

Los restos de CDR se asignan de acuerdo con las definiciones de Kabat.

Ejemplo 2: Mutación de Y61 en posiciones de hipermutación y contacto

- 25 Típicamente puede llevarse a cabo selección de anticuerpos recombinantes con afinidades mejoradas usando métodos de presentación de fagos. Esto se consigue mutando aleatoriamente combinaciones de restos de CDR para generar grandes bibliotecas que contienen anticuerpos de cada secuencia de diferentes secuencias. Típicamente, los anticuerpos con afinidades mejoradas se seleccionan basándose en su capacidad para alcanzar un equilibrio en una reacción anticuerpo-antígeno. Sin embargo, cuando se expresó scFv de Y61 en la superficie del fago y se incubó con IL-12, no se pudieron encontrar condiciones de selección que permitieran al sistema alcanzar equilibrio a anticuerpo-antígeno normal. El fago scFV permaneció unido a IL-12, su puestamente debido a una interacción no específica, puesto que scFv de Y61 purificado muestra cinética de disociación normal. Puesto que los métodos habituales de maduración de afinidad de presentación de fagos a Y61 (es decir generación de biblioteca y selecciones por mutagénesis de múltiples restos de CDR) no podían utilizarse, se desarrolló una nueva estrategia en la que se mutaban posiciones de CDR individuales.

- Esta estrategia implica la selección de posiciones de CDR apropiadas para mutación y se basa en la identificación y selección de aminoácidos que son posiciones de mutagénesis selectiva preferidas, posiciones de contacto y/o posiciones de hipermutación. Las posiciones de contacto se definen como restos que tienen una alta probabilidad de

contacto con un antígeno cuando el antígeno interacciona con el anticuerpo, mientras que las posiciones de hipermutación se definen como restos que se considera que tienen una alta probabilidad de hipermutación somática durante maduración de afinidad *in vivo* del anticuerpo. Son posiciones de mutagénesis selectiva preferidas posiciones de CDR que son posiciones tanto de contacto como de hipermutación. El anticuerpo Y61 ya se optimizó en las regiones de CDR3 usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, por lo tanto fue difícil mejorar adicionalmente el área que queda en el centro del sitio de unión al anticuerpo usando métodos de selección de presentación de fagos. Se obtuvieron mayores mejoras de la actividad por mutación de posiciones de contacto potenciales fuera de las regiones CDR3 retirando un contacto perjudicial al antígeno-anticuerpo u obteniendo por ingeniería genética un nuevo contacto.

Se muestran restos de aminoácidos de Y61 que se consideraron puntos de contacto con antígeno, y las posiciones de CDR que son sitios de hipermutaciones somáticas durante maduración de afinidad *in vivo*, en la Tabla 3 (véase Apéndice A). Para maduración de afinidad de Y61, se seleccionaron 15 restos fuera de CDR3, 3 restos dentro del bucle L3, y 5 restos en el bucle H3 para mutagénesis por PCR.

Se introdujo por clonación gen de scFv de Y61 en el vector plasmídico pUC119 (Sfi) para mutagénesis. Se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos con codones aleatorios para mutar cada posición seleccionada. Después de mutagénesis por PCR, se secuenció un pequeño número de clones (~24) y se expresó en una célula hospedadora, por ejemplo, en una célula hospedadora bacteriana, de levadura o de mamífero. El anticuerpo expresado se purificó y la k_{off} se midió usando un sistema BIAcore. Se ensayaron después clones con velocidades de disociación mejoradas, en comparación con Y61, en ensayos de neutralización. Este procedimiento se repitió para otras posiciones de CDR. Se combinaron mutaciones individuales que se ha mostrado que tienen actividad de neutralización mejorada para generar un anticuerpo con potencia de neutralización aún mayor.

Las posiciones de CDR de Y61 que se mutaron para mejorar la potencia de neutralización, y las sustituciones de aminoácidos respectivas en cada posición se muestran en las Figuras 2A-2H. Se proporcionan velocidades de disociación, como se determina por análisis de BIAcore. Estas velocidades de disociación también se muestran en los histogramas a la derecha de cada tabla.

Los resultados de estas sustituciones en las posiciones H30, H32, H33, H50, H53, H54, H58, H95, H97, H101, L50, L92, L93, demostraron que todas las sustituciones de aminoácidos examinadas dieron como resultado anticuerpos con velocidades de disociación más bajas que Y61. En las posiciones H52, L32 y L50, se descubrió que solamente una sustitución de aminoácido mejoraba la velocidad de disociación de Y61, todos los otros cambios afectaron adversamente a la actividad. Para L50, este cambio se ncillo Gly → Tyr mejoró significativamente (5-10 veces) la potencia de neutralización de Y61. Los resultados demostraron la importancia de estas posiciones para actividad de Y61, y sugieren que en la mayoría de los casos la presentación de fagos fue capaz de seleccionar los restos óptimos. Sin embargo, en las posiciones H31, H56, L30 y L94, se descubrió que varias sustituciones mejoraban la velocidad de disociación de Y61, lo que sugiere que estas posiciones también eran importantes para unión de antígenos, aunque el enfoque de presentación de fagos no permitió selección de los restos óptimos.

La mutación selectiva de posiciones de contacto e hipermutación de Y61 identificó el resto de aminoácido L50 en la CDR2 de cadena ligera, y el resto L94 de la CDR3 de cadena ligera, que mejoró la capacidad de neutralización de Y61. Una combinación de estas mutaciones produjo un efecto aditivo, generando un anticuerpo, J695, que mostró un aumento significativo en la capacidad de neutralización. La secuencia de longitud completa de secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de J695 se muestra posteriormente.

Secuencia peptídica de región variable de cadena pesada de J695

CDR H1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS **SYGMH** WVRQAPGKGLEWVA

CDR H2

FIRYDGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKT

CDR H3

HGSHDN WGQGTMTVTVSS (SEC ID N°: 31)

Secuencia peptídica de región variable de cadena ligera de J695

CDR L1

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC SGSRSNIGSNTVK WYQQLPGTAPKLLIY

CDR L2

YNDQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC

CDR L3

QSYDRYTHPALL FGTGTVTVLG (SEC ID N°: 32)

Los restos de CDR se asignan de acuerdo con las definiciones de Kabat.

- 5 Se muestra un sumario de los alineamientos de secuencia de región variable de cada pesada y ligera que muestran el desarrollo de linaje de clones que estaban en la ruta de Joe9 a J695 en las Figuras 1A-1D. Las CDR y numeración de restos son de acuerdo con Kabat.

Ejemplo 3: Actividad funcional de anticuerpos anti-hIL-12

- 10 Para examinar la actividad funcional de los anticuerpos humanos anti-IL-12 humana de la invención, los anticuerpos se usaron en varios ensayos que miden la capacidad de un anticuerpo para inhibir la actividad de IL-12.

A. Preparación de linfoblastos activados por PHA humanos

- 15 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de un leukopak recogido de un donante sano por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque durante 45 minutos a 1500 rpm como se describe en Current Protocols in Immunology, Unidad 7.1. Se recogieron PBMC en la interfaz de la solución de sangre acuosa y el medio de separación de linfocitos y se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) por
- 20 centrifugación durante 15 minutos a 1500 rpm para retirar partículas Ficoll-Paque.

- Las PBMC se activaron después para formar linfoblastos como se describe en Current Protocols in Immunology, Unidad 6.16. Las PBMC lavadas se resuspendieron a $0,5-1 \times 10^6$ células/ml en medio completo de RPMI (medio RPMI 1640, suero bovino fetal 10% (FBS), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml), complementado con PHA-P 0,2% (v/v) (Difco, Detroit, MI) y se cultivaron durante cuatro días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 5%. Después de cuatro días, los cultivos celulares se dividieron 1:1 en volumen en medio completo de RPMI, más PHA-P 0,2% (v/v) e IL-2 humana recombinante 50 U/ml. Se produjo IL-2 humana recombinante por transfección de un vector de expresión que portaba el ADNc de IL-2 humana a células COS (véase Kaufman *et al.*, (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4484-4490), y se purificó como se describe en el documento PCT/US96/01382. Los cultivos celulares se incubaron
- 25 después durante de uno a tres días adicionales. Se recogieron blastocitos de PHA, se lavaron dos veces con medio completo de RPMI y se congelaron en FBS 95%, DMSO 5% a 10×10^6 células/ml.

- Se recogieron blastocitos de PHA para usar para el ensayo de unión del receptor de IL-12 (véase sección B) después de un día de cultivo en presencia de IL-2, mientras que se recogieron blastocitos de PHA para usar para el
- 35 ensayo de proliferación de blastos de PHA (véase sección C) y el ensayo de inducción de interferón gamma (véase sección D) después de cultivo de tres días en presencia de IL-2.

B. Ensayo de unión del receptor de IL-12

- 40 La capacidad de los anticuerpos anti-IL-12 para inhibir la unión de IL-12 radiomarcada con receptores de IL-12 en blastos de PHA se analizó como sigue. Se preincubaron diversas concentraciones de anticuerpo anti-IL-12 durante una hora a 37 °C con ¹²⁵I-hIL-12 50-100 pM (hIL-12 yodado se preparó usando el método de marcaje de Bolton-Hunter para una actividad específica de 20-40 mCi/mg de NEN-Dupont) en tampón de unión (RPMI 1640, FBS 5%, Hepes 25 mM pH 7,4). Los blastocitos de PHA aislados como se ha descrito anteriormente, se lavaron una vez y se
- 45 resuspendieron en tampón de unión a una densidad celular de 2×10^7 células/ml. Se añadieron blastos de PHA (1×10^6 células) a la mezcla de ¹²⁵I-hIL-12 de anticuerpo y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La radiactividad unida a célula se separó de ¹²⁵I-hIL-12 libre por centrifugación de la mezcla de ensayo durante 30 segundos a temperatura ambiente, aspiración del líquido y un lavado con 0,1 ml de tampón de unión, seguido de centrifugación a 4 °C durante 4 minutos a 10.000 x g. El sedimento celular se examinó con respecto a radiactividad
- 50 unida a célula usando un contador gamma. La unión total se determinó en ausencia de anticuerpo y se determinó unión no específica por inclusión de IL-12 no marcada 25 nM en el ensayo. Se llevaron a cabo incubaciones por duplicado.

El ensayo de unión al receptor de IL-12 usando los anticuerpos humanos anti-IL-12 Y61 y J695, ambos anticuerpos demostraron una inhibición comparable de unión con el receptor de IL-12. Y61 inhibió la unión de receptor de IL-12 con un valor de CI_{50} de aproximadamente $1,6 \times 10^{-11}$ M, mientras que J695 tenía un valor de CI_{50} de aproximadamente $1,1 \times 10^{-11}$ M.

C. Ensayo de proliferación de blastos de PHA humanos

Los anticuerpos anti-IL-12 se evaluaron con respecto a su capacidad para inhibir la proliferación de blastos por PHA (cuya proliferación se estimula por IL-12). Se preincubaron varias diluciones de anticuerpo anti-IL-12 durante 1 hora a 37 °C, CO₂ 5% con hIL-12 230 pg/ml en 100 ml de medio completo de RPMI en una placa de microtitulación (fondo en U, 96 pocillos, Costar, Cambridge, MA). Los blastocitos de PHA aislados como se ha descrito anteriormente, se lavaron una vez y se resuspendieron en medio completo RPMI a una densidad celular de 3×10^5 células/ml. Se añadieron blastos de PHA (100 ml, 3×10^4 células) a la mezcla de anticuerpo/hIL-12, se incubaron durante 3 días a 37 °C, CO₂ 5% y se marcaron durante 4-6 horas con 0,5 mCi/pocillo de (3H)-Timidina (Amersham, Arlington Heights, IL). Los contenidos de cultivo se recogieron en filtros de fibra de vidrio por medio de un recolector celular (Tomtec, Orange, CT) y se midió la incorporación de (3H)-Timidina a ADN celular por conteo de centelleo líquido. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

Los resultados de neutralización en presencia de diversas concentraciones de p70:p40 (es decir la relación de heterodímero de IL-12 y subunidad p40 libre) se muestra en la Tabla 4 (véase Apéndice A).

El análisis del anticuerpo humano anti-IL-12 Y61 en el ensayo de proliferación de blastos de PHA demostró que el anticuerpo inhibía la proliferación de blastos por PHA con un valor de CI_{50} de aproximadamente $1,8 \times 10^{-10}$ M en presencia de IL-12 p70 solamente, sin ningún exceso de p40 (relación de p70:p40 de 1:0). En presencia de un exceso de 50 veces de p40 libre (p70:p40 a una relación de 1:50), el anticuerpo Y61 inhibió la proliferación de blastos por PHA con un valor de CI_{50} de aproximadamente $1,8 \times 10^{-10}$ M. Este resultado demuestra que la capacidad de Y61 para inhibir la proliferación de blastos no está comprometida por la presencia de p40 en exceso.

El anticuerpo humano anti-IL-12, J695 inhibió la proliferación de blastos por PHA con un valor de CI_{50} de aproximadamente $1,0 \times 10^{-11}$ M en presencia de p70:p40 a una relación de 1:0. En presencia de una relación p70:p40 de 1:50, este anticuerpo inhibió la proliferación de blastos por PHA con un valor de CI_{50} de aproximadamente $5,8 \pm 2,8 \times 10^{-12}$ M (n=2), lo que demuestra que el exceso de p40 tuvo solamente un ligero efecto inhibitor en el anticuerpo. Los resultados globales demuestran actividad de neutralización mejorada de J695 en comparación con Y61 debido a las mutaciones en L50 y L94.

D. Ensayo de inducción de interferón gamma

La capacidad de los anticuerpos anti-IL-12 para inhibir la producción de IFN γ por blastos de PHA (cuya producción se estimula por IL-12) se analizó como sigue. Se preincubaron diversas concentraciones de anticuerpo anti-IL-12 durante una hora a 37 °C, CO₂ 5% con hIL-12 200-400 pg/ml en 100 ml de medio completo RPMI en una placa de microtitulación (fondo en U, 96 pocillos, Costar). Los blastocitos de PHA aislados como se ha descrito anteriormente, se lavaron una vez y se resuspendieron en medio completo RPMI a una densidad celular de 1×10^7 células/ml. Se añadieron blastos de PHA (100 μ l, 1×10^6 células) a la mezcla de anticuerpo/hIL-12 y se incubaron durante 18 horas a 37 °C y CO₂ 5%. Después de incubación, se retiraron 150 μ l de sobrenadante sin células de cada pocillo y el nivel de IFN γ humano producido se midió por ELISA (ELISA de interferón gamma Endogen, Endogen, Cambridge, MA). Cada sobrenadante se ensayó por duplicado.

El análisis de anticuerpo humano anti-hIL-12, Y61, en este ensayo demostró que Y61 inhibía la producción de IFN γ humano con un valor de CI_{50} de aproximadamente $1,6 \times 10^{-10}$ M, mientras que el anticuerpo humano anti-IL-12, J695, inhibía la producción de IFN γ humano con un valor de CI_{50} de aproximadamente $5,0 \pm 2,3 \times 10^{-12}$ M (n=3). El resultado demuestra la mejora sustancial en la afinidad de J695 como resultado de las modificaciones en L50 y L94.

E. Inducción de IL-12 no humana de PBMC aisladas

Para examinar la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-hIL-12 humanos con IL-12 de otras especies, se produjo IL-12 no humana como sigue. Se separaron PBMC de sangre heparinizada fresca por centrifugación de gradiente de densidad como se ha descrito anteriormente usando linfoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) para PBMC de mono cynomolgus, babuino y perro, Accu-paque (Accurate Chemical & Sci. Corp., Westbury, NY) para PBMC de perro o Lympholyte-rata (Accurate Chemical & Sci. Corp., Westbury, NY) para PBMC de rata.

Las PBMC se indujeron después para producir IL-12 como se ha descrito (D'Andrea *et al.*, (1992) J. Exp. Med 176, 1387-1398, Villinger *et al.*, (1995) J. Immunol. 155, 3946-3954, Buettner *et al.*, (1998) Cytokine 10, 241-248). Las PBMC lavadas se resuspendieron a 1×10^6 células/ml en medio completo de RPMI, complementado con SAC 0,0075% (p/v) (Pansorbin; Calbiochem-Behring Co., La Jolla, CA) o ConA 1-5 mg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) más SAC 0,0075 % y se incubó durante 18 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 5%. Se recogió medio sin

células y sin SAC por centrifugación y se filtró a través de filtros de 0,2 mm.

Se obtuvo IL-12 del monorhesus como IL-12 de rhesus recombinante de la Escuela Universitaria de Medicina Emory, Atlanta, GA.

F. Ensayo de proliferación de células 2D6 murinas

El clon de linfocitos T murinos 2D6 prolifera en respuesta a IL-2, IL-4, IL-7 e IL-12 (Maruo *et al.*, (1997) J. Leukocyte Biol. 61, 346-352). También se detectó una proliferación significativa en respuesta a sobrenadantes de PBMC de rata que contenían IL-12 de rata. Las células no responden a IL-12 de perro, cynomolgus, babuino o ser humano. Las células 2D6 murinas se propagaron en medio completo de RPMI complementado con betamercaptoetanol (β ME) 50 mM e IL-12 murina 30 ng/ml. Un día antes del ensayo, la IL-12 murina se retiró por lavado y las células se incubaron durante una noche en medio completo de RPMI más β ME.

Se preincubaron diluciones en serie de anticuerpo anti-IL-12 durante 1 hora a 37 °C, CO₂ 5% con IL-12 murina 40 pg/ml en 100 ml de medio completo de RPMI más β ME en una placa de microtitulación (fondo en U, 96 pocillos, Costar). Se lavaron células 2D6 una vez y se resuspendieron en medio completo RPMI que contenía β ME a una densidad celular de 1×10^5 células/ml. Se añadieron células 2D6 (100μ l, 1×10^4 células) a la mezcla de anticuerpo/hIL-12, se incubaron durante 3 días a 37 °C, CO₂ 5% y se marcaron durante 4-6 horas con (³H)-Timidina 0,5 mCi/pocillo. Los conteos del cultivo se recogieron y contaron por conteo de centelleo líquido. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

G. Reactividad cruzada de especie de J695 con IL-12 no humana

Se analizó la reactividad cruzada de especie de J695 con IL-12 no humana usando PBMC aisladas de varias especies no humanas. La presencia de actividad de IL-12 no humana en sobrenadantes de PBMC de rata, perro, cynomolgus y babuino se confirmó usando varios bioensayos descritos anteriormente, tales como el ensayo de proliferación de células 2D6 murinas, el ensayo de proliferación de blastos por PHA humanos y el ensayo de inducción de interferón gamma bloqueando las respuestas inducidas por PBMC no humanas con anticuerpos policlonales de conejo y/u oveja a IL-12 murina y/o humana. La reactividad cruzada de los anticuerpos humanos anti-IL-12 Y61 y J695 con IL-12 no humana en sobrenadantes de PBMC o IL-12 murina y de rhesus purificada se evaluó después en el mismo bioensayo o bioensayos determinando la concentración de anticuerpo J695 a la que se observó 50% de inhibición de la respuesta. Los resultados de reactividad cruzada de especie se resumen en la Tabla 5. Los resultados demuestran que Y61 y J695 son cada una capaz de reconocer IL-12 de monos (por ejemplo IL-12 de cynomolgus y rhesus para Y61, y cynomolgus, rhesus y babuino para J695) y que J695 es aproximadamente 35 veces menos activo en IL-12 de perro; ni Y61 ni J695 reaccionan de forma cruzada con IL-12 de ratón o de rata.

H. Especificidad de citocinas humanas de J695

La especificidad de J695 se ensayó en un ELISA de competición en el que se ensayó un panel de citocinas humanas con respecto a su capacidad para interferir con la unión de J695 soluble con IL-12 humana inmovilizada. El panel de citocinas humanas incluyó IL-1 α e IL-1 β (Genzyme, Boston, MA), IL-2 (Endogen), IL-4, IL-10, IL-17, IFN-gamma, y TGF- β 1 (R&D, Minneapolis, MN) IL-8 (Calbiochem), PDGF, IGF-I, y IGF-II (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), TNF α y linfotóxina, IL-6, receptor de IL-6 soluble, IL-11, IL-12 p70, IL-12 p40, M-CSF y LIF. EBI-3, una proteína relacionada con p40 de IL-12 que se induce por infección por virus de Epstein-Barr en linfocitos B (Devergne *et al.*, (1996) J. Virol. 70, 1143-1153) se expresó como una quimera de IgG-Fc humana (EBI-3/Fc). También se ensayó ADN de esperma de salmón monocatenario (Sigma).

Tabla 5 Datos de Reactividad Cruzada de Especies

Anticuerpo		CI ₅₀ (M)						
		IL-12 de ratón	IL-12 de rata	IL-12 de perro	IL-12 de cyno	IL-12 de rhesus	IL-12 de babuino	IL-12 humana
Nombre	Especificidad	Purificada	PBMC sup	PBMC sup	PBMC sup	Purificada	PBMC sup	Purificada
C17.15	α mIL12 de rata	$3,0 \times 10^{-11}$						
R03B03	α mIL12 de conejo	$1,5 \times 10^{-10}$	$6,0 \times 10^{-10}$					
C8.6.2	α hIL12 de ratón				$1,2 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^{-10}$	$2,0 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-11}$

Cl ₅₀ (M)								
Anticuerpo		IL-12 de ratón	IL-12 de rata	IL-12 de perro	IL-12 de cyno	IL-12 de rhesus	IL-12 de babuino	IL-12 humana
Nombre	Especificidad	Purificada	PBMC sup	PBMC sup	PBMC sup	Purificada	PBMC sup	Purificada
Y61	α hIL12 humana	No neutralizadora			$2,2 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^{-10}$		$1,7 \times 10^{-10}$
J695	α hIL12 humana	No neutralizadora	No neutralizadora	$3,5 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^{-11}$	$1,0 \times 10^{-11}$	$1,5 \times 10^{-11}$	$5,0 \times 10^{-12}$

Se recubrieron placas de microtitulación de inmunoensayo de ELISA de fondo plano (96 pocillos, alta unión, Costar) durante una noche a 4 °C con 0,1 ml de IL-12 humana (2 µg/ml en tampón de recubrimiento de carbonato 0,1 M (4 volúmenes de NaHCO₃ 0,1 M más 8,5 volúmenes de NaHCO₃ 0,1 M)). Las placas se lavaron dos veces con PBS que contenía Tween 20 (PBS-T) 0,05%, se bloquearon con 200 µl de albúmina de suero bovino 1 mg/ml (BSA, Sigma) en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron de nuevo dos veces con PBS-T. Las muestras (100 µl) que contenían anticuerpo de IL-12 J695 (100 ng/ml) y cada citocina (2nM) en PBS-T que contenía BSA 50 µg/ml (PBS-T/BSA) se añadieron y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4 veces y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl de HRP lambda anti-humano de ratón (1:500 en PBS-T/BSA, Southern Biotech. Ass. Inc., Birmingham, AL). Las placas se lavaron 4 veces y se revelaron con ABTS (Kirkegaard & Perry Lab., Gaithersburg, MD) durante 20-30 minutos en oscuridad. La DO₄₅₀ nm se leyó usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Menlo Park, CA). El porcentaje de unión se determinó en relación con unión de J695 con la placa recubierta con IL-12 en ausencia de cualquier citocina soluble.

Los resultados demostraron que la unión de J695 con IL-12 humana inmovilizada se bloqueó solamente por p70 de IL-12 humana y en menor grado, por p40 de IL-12 humana y no por cualquiera de las otras citocinas ensayadas.

I. Unión con una molécula de IL-12 nueva

Se ha descrito un heterodímero de IL-12 alternativo, en el que la subunidad p35 se reemplaza por una molécula p19 nueva. P19 se identificó usando búsqueda de homología 3D de miembros de la familia IL-6/IL-12, y se sintetiza por células dendríticas activadas. P19 se une a p40 para formar un dímero p19/p40, que tiene actividad de tipo IL-12, pero no es tan potente como el heterodímero p35/p40 en inducción de IFN γ . Se espera que los anticuerpos que reconocen p40 solo, pero preferiblemente en el contexto de una molécula p70 (por ejemplo, J695 e Y61, véase Ejemplo 3H) también neutralicen tanto las moléculas p35/p40 como las moléculas p19/p40.

Ejemplo 4: Actividad *in vivo* de anticuerpo anti-hIL-12

Los efectos *in vivo* de anticuerpos de IL-12 e n respuestas inducidas por IL-12 se examinaron en un modelo modificado del usado por Bree *et al.* para estudiar el efecto de IL-12 humana en hematología periférica en monos cynomolgus, Bree *et al.*, (1994) Biochem Biophys Res. Comm. 204: 1150-1157. En esos estudios anteriores, la administración de IL-12 humana a 1 µg/kg/día durante un periodo de 5 días dio como resultado una reducción del recuento de glóbulos blancos (WBC), especialmente en los subconjuntos de linfocitos y monocitos después de 24 horas. Se observó una reducción en el recuento de plaquetas a las 72 horas. Los niveles de neopterina en plasma, un marcador de activación de monocitos en respuesta a IFN- γ , comenzaron a elevarse a las 24 horas y fueron más altos a las 72 horas.

En el primer estudio con anticuerpos humanos anti-hIL-12, quince monos cynomolgus sanos con un peso medio de 5 kg, se sedaron y dividieron en 5 grupos (n=3). El grupo 1 recibió una administración intravenosa (IV) de 10 mg/kg de inmunoglobulina intravenosa humana (IVIG, Miles, Eckhart, IN, purificada usando proteína A Sepharose). El grupo 2 recibió una administración intravenosa de 1 mg/kg de C8.6.2 (anticuerpo de ratón neutralizador monoclonal anti-IL-12 humana). El grupo 3 recibió una administración intravenosa de 10 mg/kg de C8.6.2. El grupo 4 recibió una administración intravenosa de 1 mg/kg de Y61 (anticuerpo humano anti-IL-12 humana, purificado a partir de medio acondicionado para células CHO). El grupo 5 recibió una administración intravenosa de 10 mg/kg de Y61.

Una hora después de la administración de anticuerpo todos los animales recibieron una inyección subcutánea sencilla (SC) de IL-12 humana (1 µg/kg). Se tomaron muestras sanguíneas en los siguientes puntos temporales: línea basal, 8, 24, 48, 96 y 216 horas, y se analizaron con respecto a recuentos de células sanguíneas completas con diferenciales y química de suero. También se midieron los niveles de IL-12 humana en suero, anticuerpo C8.6.2, anticuerpo Y61, IFN-gamma de mono, IL-10 de mono, IL-6 de mono y neopterina en plasma.

Los animales tratados con IL-12 más anticuerpo de control IVIG (Grupo 1) mostraron muchos de los cambios hematológicos esperados, incluyendo reducciones de WBC, plaquetas, recuento de linfocitos y recuento de monocitos. Estas reducciones no se vieron o fueron menos pronunciadas en los animales tratados con el anticuerpo C8.6.2 o Y61 a 1 o 10 mg/kg (Grupos 2-5).

Se analizaron muestras de suero o plasma por ELISA específico de IFN-gamma de mono o IL-10 de mono (Biosource International, Camarillo, CA), IL-6 de mono (Endogen) y neopterin en plasma (ICN Pharmaceuticals, Orangeburg, NY). No se detectaron IFN-gamma, IL-10 o IL-6 en ninguno de los animales tratados con IL-12 incluyendo los animales de control tratados con IL-12 más IVIG. Esto se debió probablemente al bajo nivel de exposición a IL-12 (solamente una dosis de 1 µg/kg). No obstante, los niveles de neopterin en plasma aumentaron aproximadamente tres veces en los animales tratados con IL-12 más IVIG pero no cambiaron en todos los animales tratados con C8.6.2 o Y61, incluyendo los animales tratados con dosis menor (1 mg/kg) de Y61, lo que indica que Y61 fue eficaz *in vivo* en el bloqueo de esta respuesta sensible a IL-12.

En un segundo estudio, se estudió la actividad *in vivo* y farmacodinámica (PD) de J695 en monos cynomolgus administrando rhIL-12 exógena y determinando si J695 pudo bloquear o reducir las respuestas normalmente asociadas con administración de rhIL-12. Se administró a monos cynomolgus macho (n=3 por grupo) una dosis sencilla de 0,05, 0,2 o 1,0 mg/kg de J695 o 1 mg/kg de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) como una inyección intravenosa de embolada (IV) a través de una vena safena o por vía subcutánea (SC) en la piel dorsal. Una hora después de la administración de J695 o IVIG todos los animales recibieron una dosis sencilla de 1 µg/kg de rhIL-12 en la piel dorsal. Se recogieron muestras sanguíneas a través de la vena femoral hasta 28 días después de la administración de J695. Se adquirió suero de cada muestra sanguínea y se ensayó con respecto a IL-12, J695, IFN-γ y anticuerpos anti-J695 por ELISA. Se ensayó neopterin por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa.

Los niveles de neopterin, normalizados con respecto a los niveles de neopterin que se midieron antes de la administración de J695 o rhIL-12, se muestran en la Figura 3. Para comparar la supresión de neopterin entre grupos, el área bajo la curva (AUC) normalizado para niveles de neopterin se calculó para cada animal (Tabla 6). La exposición a neopterin (AUC) se suprimió de una manera dependiente de dosis entre aproximadamente 71 y 93% en los grupos IV y entre 71 y 100% en los grupos SC, en relación con los grupos de control IVIG. Estos resultados sugieren que la dosis de J695 necesaria para inhibición al 50% de la respuesta a neopterin (DE₅₀) fue menor de 0,05 mg/kg cuando se administró por la vía IV o SC.

Tabla 6: Supresión Dependiente de Dosis de Neopterin Inducida por IL-12 por J695 en Monos Cynomolgus

Vía de dosificación de IVIG o J695 y rhIL-12	Dosis de J695 (mg/kg)	Dosis de IVIG (mg/kg)	AUC de Niveles de Neopterin Normalizados	% Reducción de AUC de Neopterin en Comparación con Control
Inyección IV sencilla seguida 1 hora después de una dosis de 1 µg/kg de IL-12 humana proporcionada SC	-	1,0	1745 ± 845	0
	0,05	-	502 ± 135	71,3
	0,2	-	199 ± 316	88,6
	1,0	-	128 ± 292	92,7
Inyección SC sencilla seguida 1 hora después de una dosis de 1 µg/kg de IL-12 humana proporcionada SC	-	1,0	1480 ± 604	0
	0,05	-	426 ± 108	71,2
	0,2	-	395 ± 45,9	73,3
	1,0	-	0 ± 109	100

El tratamiento con J695 también evitó o redujo los cambios en hematología normalmente asociada con administración de rhIL-12 (leucopenia y trombocitopenia). A las 24 horas después de administración de rhIL-12 los recuentos de linfocitos se redujeron en aproximadamente 50% en comparación con los valores de línea basal en los grupos tratados con IVIG SC e IV de control. La administración de J695 bien SC o bien IV a los tres niveles de dosis evitaron esta reducción, dando como resultado recuentos de linfocitos a las 24 horas aproximadamente iguales que los valores de línea basal. A las 48 horas después de administración de IL-12, los recuentos de plaquetas y los grupos tratados con IVIG SC e IV se redujeron en aproximadamente 25% en comparación con los valores de línea basal.

Un programa de dosis ejemplar dirigido a mantener los niveles en suero por encima del nivel del 90% de efecto serían 1 mg/kg IV y SC proporcionados aproximadamente cada dos semanas, o 0,3 mg/kg proporcionados aproximadamente cada semana, asumiendo acumulación ligera durante dosificación repetida. Este estudio demuestra que el anticuerpo puede proporcionarse de forma segura a monos a tales dosificaciones. En estudios de toxicidad independientes, se descubrió además que pueden proporcionarse de forma segura a monos hasta 100 mg/kg del anticuerpo.

J695 también fue eficaz en la prevención de producción de IFN- γ en ratones tratados con una IL-12 quimérica, una molécula que combina la subunidad p35 murina con la subunidad p40 de IL-12 humana. A diferencia de IL-12 humana que es biológicamente inactiva en ratones, esta IL-12 quimérica conserva función biológica en ratones, incluyendo inducción de IFN- γ . Además, la subunidad p40 humana permite a la molécula unirse y neutralizarse por J695. Se administró IL-12 quimérica a una dosis de 0,05 mg/kg i.p. a ratones C3H/HeJ hembra (10/grupo experimental) en cinco dosis diarias los días 0, 1, 2, 3 y 4. Se proporcionó J695 los días 0, 2 y 4 a las dosis de 0,05, 0,01, 0,002, 0,0004, 0,00008 y 0,000016 mg/kg i.p., 30 minutos antes de las inyecciones de IL-12. Se proporcionó el hulgG1 γ de control IP a una dosis de 0,05 mg/kg los días 0, 2 y 4. Se tomaron muestras sanguíneas de los ratones el día 5, y se determinaron los niveles de IFN- γ en suero por ELISA. Los resultados demostraron que J695 provocó inhibición dependiente de dosis de producción de IFN- γ con una DE₅₀ de aproximadamente 0,001 mg/kg. De forma colectiva, estos resultados demuestran que J695 es un potente inhibidor de actividad de IL-12 *in vivo*.

Ejemplo 5: Análisis cinético de unión de anticuerpos humanos con IL-12 humana recombinante (rhIL-12)

Se midieron interacciones de unión en tiempo real entre ligando capturado (anticuerpo humano anti-rhIL12 J695, capturado en una matriz biosensora) y analito (rhIL12 en solución) por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando el sistema BiAcCore (Biacore AB, Uppsala, Suecia). El sistema utiliza las propiedades ópticas de SPR para detectar alteraciones en la concentración de proteínas dentro de una matriz biosensora de dextrano. Las proteínas se unen covalentemente a la matriz de dextrano a concentraciones conocidas. Los anticuerpos se inyectan a través de la matriz de dextrano y la unión específica entre anticuerpos inyectados y ligando inmovilizado da como resultado una concentración de proteína de matriz aumentada y cambio resultante en la señal de SPR. Estos cambios en señal de SPR se registran como unidades de resonancia (UR) y se representan con respecto al tiempo a lo largo del eje y de un sensograma.

Para facilitar la inmovilización de IgG anti-humano de cabra (Southern Biotechnology Associates, Cat. N° 2040-01, Birmingham, AL) en la matriz biosensora, IgG anti-humano de cabra se une covalentemente mediante grupos de amina libre con la matriz de dextrano activando en primer lugar grupos carboxilo en la matriz con N-hidroxisuccinimida (NHS) 100 mM y clorhidrato de N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 400 mM. A continuación, se inyecta IgG anti-humano de cabra a través de la matriz activada. Se inyectan treinta y cinco microlitros de IgG anti-humano de cabra (25 μ g/ml), diluido en acetato sódico, pH 4,5, a través del biosensor activado y las aminas libres en la proteína se unen directamente a los grupos carboxilo activados. Los ésteres de EDC de matriz que no han reaccionado se desactivan por una inyección de etanolamina 1 M. Están disponibles en el mercado kits de acoplamiento de amina convencionales (Biacore AB, Cat. N° BR-1000-50, Uppsala, Suecia).

J695 se diluyó en tampón de ejecución HBS (Biacore AB, Cat. N° BR-1001-88, Uppsala, Suecia) para capturarse en la matriz mediante IgG anti-humano de cabra. Para determinar la capacidad de anticuerpos específicos de rhIL-12 para unir IgG anti-humano de cabra inmovilizada, se realizó un ensayo de unión como sigue. Se inyectaron alícuotas de J695 (25 μ g/ml; alícuotas de 25 μ l) a través de la matriz de dextrano acoplada con anticuerpo policlonal de IgG anti-humano de cabra a un caudal de 5 μ l/minuto. Antes de la inyección de la proteína e inmediatamente después, se hizo fluir tampón HBS a través de cada celda de flujo. Se interpretó que la diferencia neta de señal entre la línea basal y el punto correspondiente a aproximadamente 30 segundos después de la compleción de inyección de J695 representaba la cantidad de IgG1 J695 unido (aproximadamente 1200 UR). Se midió la unión de anticuerpo específica de rhIL-12 directa con rhIL-12 soluble. Las citocinas se diluyeron en tampón de ejecución HBS y se inyectaron alícuotas de 50 μ l a través de las matrices de proteína inmovilizada a un caudal de 5 μ l/minuto. Las concentraciones de rhIL-12 empleadas fueron 10, 20, 25, 40, 50, 80, 100, 150 y 200 nM. Antes de la inyección de rhIL-12, e inmediatamente después, el tampón HBS solo fluyó a través de cada celda de flujo. Se interpretó que la diferencia neta de señal de línea basal y señal después de la compleción de inyección de citocinas representaba el valor de unión de la muestra particular. Se regeneraron matrices biosensoras usando HCl 100 mM antes de la inyección de la siguiente muestra. Para determinar la constante de disociación (velocidad de disociación), constante de asociación (velocidad de asociación), se usó software de evaluación cinética BiAcCore (versión 2.1).

Se muestran resultados representativos de unión de J695 derivado de CHO con rhIL-12 en comparación con J695 derivado de COS, en la Tabla 7.

Tabla 7: Unión de J695 derivado de CHO o COS con rhIL-12.

Fuente	rhIL12, nM	rhIL12 unido, UR	Ab, unido, UR	rhIL12/AB
CHO	200	1112	1613	1,48
CHO	150	1033	1525	1,45
CHO	100	994	1490	1,43
CHO	80	955	1457	1,40
CHO	50	912	1434	1,36
CHO	40	877	1413	1,33
CHO	25	818	1398	1,25

Fuente	rhIL12, nM	rhIL12 unido, UR	Ab, unido, UR	rhIL12/AB
CHO	20	773	1382	1,20
CHO	10	627	1371	0,98
COS	200	1172	1690	1,49
COS	150	1084	1586	1,46
COS	100	1024	1524	1,44
COS	80	985	1489	1,42
COS	50	932	1457	1,37
COS	40	894	1431	1,34
COS	25	833	1409	1,27
COS	20	783	1394	1,20
COS	10	642	1377	1,00

Se analizaron cuantitativamente interacciones cinéticas moleculares entre J695 capturado y rhIL-12 soluble usando tecnología BIAcore. Se realizaron varios experimentos independientes y los resultados se analizaron por el software de análisis matemático de BIAcore para derivar constantes de velocidades cinéticas, como se muestra en la Tabla 8.

5

Tabla 8: Velocidad cinética aparente y constantes de afinidad de J695 para rhIL-12.

Anticuerpo	Fuente	Velocidad de asociación ($M^{-1}s^{-1}$), Media	Velocidad de disociación (s^{-1}), Media	Kd (M), Media
J695	CHO	3,52E+05	4,72E-05	1,34E-10
J695	COS	3,40E+05	2,61 E-05	9,74E-11

10 Hubo una pequeña diferencia entre la constante aparente calculada (Kd) para la interacción entre anticuerpos J695 derivados de CHO ($K_d = 1,34 \cdot 10^{-10} M^{-1}$) y J695 derivados de COS ($K_d = 9,74 \times 10^{-11} M^{-1}$). La constante de disociación aparente (Kd) entre J695 y rhIL12 se estimó a partir de las constantes de velocidad observadas por la fórmula: $K_d = \text{velocidad de disociación/velocidad de asociación}$.

15 Para determinar la constante de velocidad de asociación y disociación aparente para la interacción entre J695 y rhIL-12, se realizaron varias reacciones de unión usando una cantidad fija de J695 (2 $\mu g/ml$) y diversas concentraciones de rhIL-12. Los sensores de interacción de unión en tiempo real entre J695 capturado y rhIL-12 soluble mostraron que ambas formas de anticuerpo eran muy similares para la fase tanto de asociación como de disociación.

20 Para evaluar adicionalmente la capacidad de mAb IgG1 J695 capturado para unir citocina recombinante soluble, se usó un método de BIAcore directo. En este método, se recubrió una superficie de sensor de carboximetil dextrano acoplado a IgG anti-humano de cabra (25 $\mu g/ml$) con IgG1 J695 (2 $\mu g/ml$) y se añadió después citocina recombinante. Cuando se inyectó rhIL-12 soluble a través de una superficie biosensora capturada con IgG1 J695 derivado de CHO o COS, la cantidad de señal aumentó a medida que aumentaba la concentración de citocinas en la solución. No se observó unión con rhIL-12 (R&D Systems, Cat. N° 419-ML, Minneapolis, MN) o rhIL12 a cualquier concentración ensayada hasta 1000 nM. Estos resultados apoyan la conclusión de que los anticuerpos IgG1 J695 reconocen un determinante definido en rhIL-12.

30 La tabla 9 muestra los resultados de un experimento usando BIAcore para demostrar la unión de mAb IgG1 J695 humano con rhIL12 solamente soluble y ninguna de las otras citocinas recombinantes.

Tabla 9: Mapeo de epítomos de J695 usando tecnología BIAcore.

	J695 de COS con ligando capturado	J695 de CHO con ligando capturado
Analito soluble		
IL12 humano rec.	Positivo	Positivo
IL12 murino rec.	Negativo	Negativo

35 Ejemplo 6: Estudios adicionales de afinidad de J695 por IL-12

Se analizaron de forma cuantitativa las interacciones cinéticas moleculares entre anticuerpo J695 e IL-12 humana usando tecnología de resonancia de plasmón de BIAcore, y se derivaron las constantes de velocidades cinéticas aparentes.

40

Se usó tecnología BIAcore para medir la unión de rhIL-12 soluble con J695 capturado en fase sólida. Se inmovilizó un anticuerpo IgG anti-humano de cabra en las microplacas biosensoras, después se inyectó una cantidad fija de J695 y se capturó en la superficie. Se aplicaron diversas concentraciones de rhIL-12, y se midió la unión de IL-12 a diferentes concentraciones de J695 en función del tiempo. Se calcularon las constantes de velocidades de disociación y asociación aparentes, asumiendo disociación de orden cero y cinética de asociación de primer orden, así como interacción molecular uno a uno se enciella entre J695 e IL-12. Se realizaron tres experimentos independientes, y los valores mostrados son medias de los tres experimentos. A partir de estas medidas, se derivaron las constantes de velocidad de disociación (k_d) y asociación (k_a) aparentes y se usaron para calcular un valor de K_d para la interacción (véase Tabla 10). Los resultados indicaron que J695 tiene una alta afinidad por rhIL-12.

Tabla 10: Parámetros Cinéticos para Interacción entre J695 e IL-12 Humana

Parámetro cinético	Valor
k_d	$3,71 \pm 0,40 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
k_a	$3,81 \pm 0,48 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
K_d	$9,74 \times 10^{-11} \text{ M}$ (14 ng/ml)

Ejemplo 7: Características y actividad de neutralización de C17.15, un anticuerpo monoclonal de rata para interleucina-12 murina

Para evaluar la relevancia de estudios de tratamiento de IL-12 en modelos de ratón de inflamación y autoinmunidad usando anticuerpo monoclonales específicos para IL-12 murina para enfoques similares en enfermedad humana, se examinó la interacción de C17.15, un anticuerpo monoclonal anti-IL-12 murina de rata con IL-12 murina. Se evaluó la capacidad de C17.15 para neutralizar la actividad de IL-12 murina en un ensayo de proliferación de blastos por PHA, y para bloquear la unión de IL-12 murina con receptores de superficie celular, así como la cinética de la interacción de unión de C17.15-IL-12 murina.

En un ensayo de proliferación de blastos por PHA humano (Véase Ejemplo 3), se preincubaron diluciones en serie de C17.15 o IgG2a de rata (un anticuerpo de control) con IL-12 murina 230 pg/ml durante 1 hora a 37 °C. Se añadieron blastocitos estimulados por PHA a las mezclas de IL-12-anticuerpo y se incubaron durante 3 días a 37 °C. Las células se marcaron posteriormente durante 6 horas con [^3H]-timidina 1 μCi /pocillo. Los cultivos se recogieron y se midió la incorporación de [^3H]-timidina. Se midió la proliferación no específica de fondo en ausencia de IL-12 murina añadida. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Se descubrió que la CI_{50} (M) de C17.15 para IL-12 murina recombinante en este ensayo era $1,4 \times 10^{-11}$, en comparación con el valor de CI_{50} de $5,8 \times 10^{-12}$ observada para J695 para IL-12 recombinante en las mismas condiciones (véase Tabla 11).

Tabla 11: Comparación de las propiedades de anticuerpo monoclonal anti-IL-12 humana J695 y el anticuerpo monoclonal de rata anti-IL-12 de ratón C17.15

Anticuerpo	Epítipo	Ensayo de Interacción Biomolecular			Ensayo de Unión del Receptor	Ensayo de blastos de PHA
		k_a , velocidad de asociación ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d , velocidad de disociación (s^{-1})	$K_d(\text{M})$	$\text{CI}_{50} (\text{M})$	$\text{CI}_{50} (\text{M})$
J695	Hu p40	$3,81 \times 10^5$	$3,71 \times 10^{-5}$	$9,74 \times 10^{-11}$	$1,1 \times 10^{-11}$	$5,8 \times 10^{-12}$
C17.15	Mu p40	$3,80 \times 10^5$	$1,84 \times 10^{-4}$	$4,80 \times 10^{-10}$	$1,5 \times 10^{-10}$	$1,4 \times 10^{-11}$

La capacidad de C17.15 para inhibir la unión de IL-12 murina con receptores celulares también se midió. Se preincubaron diluciones en serie de C17.15 durante 1 hora a 37 °C con [^{125}I]-IL-12 murina 100 pM en tampón de unión. Las células 2D6 (2×10^6) se añadieron a la mezcla de anticuerpo/[^{125}I]-IL-12 murina y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La radioactividad unida a célula se separó de [^{125}I]-IL-12 libre, y se determinó la radioactividad unida a célula restante. La unión total de la IL-12 murina marcada con receptores en células 2D6 se determinó en ausencia de anticuerpo, y se determinó la unión no específica mediante la inclusión de IL-12 murina no marcada 25 mM en el ensayo. La unión específica se calculó como la unión total menos la unión no específica. Las incubaciones se llevaron a cabo por duplicado. Los resultados mostraron que C17.15 tiene una CI_{50} (M) de $1,5 \times 10^{-10}$ para inhibición de IL-12 murina con receptores celulares.

La afinidad de C17.15 por IL-12 murina recombinante se evaluó mediante análisis de interacción biomolecular. Se inmovilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG de rata en las microplacas biosensoras, seguido de una inyección de una cantidad fija del anticuerpo C17.15, dando como resultado captura de C17.15 en la superficie de la microplaca. Se aplicaron diversas concentraciones de IL-12 murina recombinante a la superficie de C17.15, y la unión de IL-12 murina con el C17.15 inmovilizado se midió en función del tiempo. Se calcularon las constantes de velocidad de disociación y asociación aparentes, asumiendo una disociación de orden cero y cinética de asociación de primer

orden así como una interacción molecular uno a uno sencilla entre el C17.15 inmovilizado e IL-12 murina. A partir de estas mediciones, se calcularon las constantes de velocidad de disociación (k_d , velocidad de disociación) y asociación (k_a , velocidad de asociación) aparentes. Estos resultados se usaron para calcular un valor de K_d para la interacción. Se observó una tasa de asociación de $3,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, una velocidad de disociación de $1,84 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, y una K_d de $4,8 \times 10^{-10}$ para la interacción IL-12 murina recombinante-C17.15.

Las actividades observadas de C17.15 en actividad de IL-12 murina neutralizadora y unión con receptores de superficie celular, así como la cinética de unión de C17.15 con IL-12 murina se correlacionan con mediciones similares para la interacción J695-rhIL-12. Esto indica que los modos de acción del anticuerpo de rata anti-IL-12 de ratón C17.15 y anticuerpo anti-IL-12 humana J695 son casi idénticos basándose en velocidad de asociación, velocidad de disociación, K_d , CI_{50} , y el ensayo de blastos de PHA. Por lo tanto, se usó C17.15 como un anticuerpo homólogo a J695 en modelos murinos de inflamación y enfermedad autoinmune para estudiar los efectos del bloqueo de IL-12 en el inicio o progresión de enfermedad en estos modelos animales (véase Ejemplo 8).

Ejemplo 8: Tratamiento de enfermedades autoinmunes o basadas en inflamación en ratones por administración de anticuerpo α -IL-12 murina

A. Supresión de artritis inducida por colágeno en ratones por el anticuerpo α -IL-12 C17.15

Se ha demostrado una correlación entre los niveles de IL-12 y artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, se han detectado niveles elevados de p70 de IL-12 en los sinovios de pacientes con AR en comparación con controles sanos (Morita *et al.* (1998) *Arthritis and Rheumatism*. 41: 306-314). Por lo tanto, se evaluó la capacidad de C17.15, un anticuerpo de rata anti-IL-12 de ratón para suprimir artritis inducida por colágeno en ratones.

Se inmunizaron ratones macho DBA/1 (10/grupo) con colágeno de tipo II el Día 0 y se trataron con C17.15, o IgG de rata de control a 10 mg/kg por vía intraperitoneal en días alternos del Día -1 (1 día antes de inmunización por colágeno) al Día 12. Los animales se supervisaron clínicamente con respecto al desarrollo de artritis en las patas hasta el Día 90. La artritis se clasificó como: 0-normal; 1-artritis localizada en una articulación; 2-más de una articulación implicada pero no la pata completa; 3-pata completa implicada; 4-deformidad de la pata; 5-anquilosis de las articulaciones implicadas. La puntuación artrítica de un ratón fue la suma de las clasificaciones artríticas en cada pata individual del ratón (máximo = 20). Los resultados se expresan como media $\pm$ ETM en cada grupo.

Los resultados, como se muestran en la Figura 4, indican que una puntuación artrítica fue medible en los ratones tratados con C17.15 solamente después del día 50 posttratamiento, y que la puntuación artrítica media pico obtenida con los ratones tratados con C17.15 fue a lo menos 5 veces menor que la medida en los ratones tratados con IgG. Esto demostró que el anticuerpo de rata anti-IL-12 de ratón C17.15 evitó el desarrollo de artritis inducida por colágeno en ratones.

B. Supresión de colitis en ratones por el anticuerpo de rata α -IL-12 murina C17.15

Se ha demostrado también que IL-12 desempeña un papel en el desarrollo/patología de colitis. Por ejemplo, se ha mostrado que anticuerpos anti-IL-12 suprimen la enfermedad en modelos de ratón de colitis, por ejemplo, ratones knockout para IL-2 con colitis inducida por TNBS (Simpson *et al.* (1998) *J. Exp. Med.* 187(8): 1225-34). De forma similar, se ha demostrado que anticuerpos anti-IL-2 suprimen formación de colitis en ratones knockout para IL-10. La capacidad del anticuerpo de rata anti-IL-12 de ratón, C17.15, para suprimir colitis TNBS en ratones se evaluó en dos estudios (Davidson *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161 (6): 3143-9).

En el primer estudio, la colitis se indujo en ratones SJL sin patógenos mediante la administración de 150 μ l de solución de etanol al 50 % que contenía 2,0 mg de TNBS suministrados mediante un catéter de arteria umbilical pediátrica al recto. Los animales de control se trataron con 150 μ l de solución de etanol al 50% solamente. Se proporcionó una dosis sencilla de 0,75, 0,5, 0,25 o 0,1 mg de C17.15 o 0,75 mg de IgG2a de rata de control por vía intravenosa a través de la vena de la cola el día 11, y el efecto terapéutico del tratamiento se evaluó pesando los animales los días 11 y 17, y por puntuación histológica el día 17. El peso de los ratones tratados con C17.15 aumentó en un periodo de 48 horas del tratamiento de anticuerpo y se normalizó el día 6 después de tratamiento. El efecto del tratamiento con C17.15 se confirmó de forma histológica. Además, también se realizaron evaluaciones de secreción de IFN- γ por linfocitos T CD4+ a partir de bazo y colon de los ratones tratados, así como niveles de IL-12 de macrófagos derivados de colon o bazo de los ratones tratados (véase Tabla 12).

En el segundo estudio, la dosificación se optimizó y los ratones se trataron con una dosis total de 0,1 mg o 0,5 mg de C17.15 o 0,1 mg de IgG2a de control, respectivamente, dividido entre los días 12 y 14. Se descubrió que la administración de C17.15 en una dosis sencilla a la dosificación de 0,1 mg/ratón o 0,25 mg/ratón condujo solamente a mejora parcial en colitis inducida por TNBS y no dio como resultado una reducción significativa de la producción por linfocitos T CD4+ de IFN- γ *in vitro*, pero sí dio como resultado una reducción significativa de la secreción de IL-12, en comparación con controles no tratados. A una dosis sencilla de 0,5 mg/ratón o más se observó una respuesta. Tomando la dosis más baja de anticuerpo ensayado y administrándola en dos inyecciones divididas (los

días 12 y 14) mejoró el régimen de dosificación, lo que indica que múltiples dosis bajas pueden ser más eficaces que una dosis de embolada sencilla. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: mAb anti-IL-12 de ratón C17.15 Suprime Colitis Establecida en Ratones

Día de Inducción de Enfermedad 0	Día de Tratamiento 11	Peso (g)		Células CD4+ de bazo con IFN- γ (U/ml)	Macrófagos de bazo con IL-12 (pg/ml)
		Día 11	Día 17		
TNBS + Etanol	IgG2a de control 0,75 mg	16,0	15,26	3326	300
TNBS + Etanol	C17.15 0,75 mg	16,0	20,21	1732	0
TNBS + Etanol	C17.15 0,5 mg	16,36	19,94	1723	0
TNBS + Etanol	C17.15 0,25 mg	16,28	17,7	3618	7
TNBS + Etanol	C17.15 0,1 mg	16,2	17,98	3489	22
Control de etanol	-	20,76	21,16	1135	0

La administración de anti-IL-12 monoclonal C17.15 en dos dosis divididas separadas por un día sumando un total de 0,1 mg/ratón o 0,5 mg/ratón condujo a inversión completa de colitis como se evaluó por debilitamiento y apariencia macroscópica del colon. Además, este programa de dosis condujo a regulación negativa significativa de producción por linfocitos T de la lámina propia de IFN- γ y producción por macrófagos de IL-12, de modo que la última fue comparable a niveles vistos en ratones tratados con etanol de control sin colitis de TNBS. Por lo tanto, la administración de C17.15 a modelos de ratón para colitis de TNBS invirtió la progresión de la enfermedad de una manera dependiente de dosis.

C. Supresión de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en ratones por anticuerpos α -IL-12

Se cree habitualmente que IL-12 desempeña un papel en la patogénesis de esclerosis múltiple (MS). Se ha mostrado que el mensajero p40 de IL-12 inducible se expresa en placas agudas de pacientes con MS pero no en lesiones de infarto cerebral inflamatorias (Windhagen, A. *et al.* (1995) J. Exp. Med. 182: 1985-1996). Los linfocitos T de pacientes con MS (pero no linfocitos T de control) estimulan la producción de IL-12 a partir de células presentadoras de antígenos a través de expresión de CD40L desregulada (Balashov, K. E. *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 599-603). Los pacientes con MS tienen secreción de IFN- γ potenciada que puede bloquearse con anticuerpos α -IL-12 *in vitro* (Balashov, K. E. *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 599-603). Se detectan niveles elevados de IL-12 en suero en pacientes con MS, pero no en otras enfermedades neurológicas (Nicoletti, F. *et al.* (1996) J. Neuroimmunol. 70: 87-90). Se ha mostrado que el aumento de la producción de IL-12 se correlaciona con actividad de enfermedad en pacientes con MS (Cormabella, M. *et al.* (1998) J. Clin. Invest. 102: 671-678). Se ha estudiado el papel de IL-12 en la patogénesis de un modelo murino de esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Leonard, J. P. *et al.* (1995) J. Exp. Med. 181: 281-386; Banerjee, S. *et al.* (1998) Arthritis Rheum. (1998) 41: S33; y Segal, B. M. *et al.* (1998) J. Exp. Med. 187: 537-546). Se sabe que la enfermedad en este modelo se induce por linfocitos T del subconjunto TH₁. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de anticuerpos α -IL-12 para evitar la aparición de EAE aguda.

Se descubrió que un anticuerpo α -IL-12 era capaz de inhibir la aparición de EAE aguda, de suprimir la enfermedad después de aparición, y de reducir la gravedad de recaídas en ratones inmunizados con el autoantígeno, proteína básica de mielina (Banerjee, S. *et al.* (1998) Arthritis Rheum. (1998) 41: S33). Los efectos benéficos de tratamiento con anticuerpo α -IL-12 en los ratones persistieron durante más de dos meses después de detener el tratamiento. También se ha demostrado que los anticuerpos anti-IL-12 suprimen la enfermedad en ratones que son receptores de linfocitos T encefalitogénicos por transferencia adoptiva (Leonard, J. P. *et al.* (1995) J. Exp. Med. 181: 281-386).

Ejemplo 9: Farmacología clínica de J695

En un estudio de cruce, de doble ciego, se administró a 64 sujetos humanos masculinos sanos dosis crecientes de J695 o placebo. La medición de C3a de fragmento del complemento antes de y 0,25 horas después de la dosificación no demostró activación del sistema de complemento. Los niveles de CRP y fibrinógeno solo aumentaron en sujetos en los que se observaron síntomas de infecciones simultáneas.

Todos los sujetos sobrevivieron y la tolerabilidad global de J695 fue muy buena. En ningún caso tuvo que detenerse el tratamiento debido a acontecimientos adversos (AA). Los AA observados más habitualmente fueron cefalea y resfriado común/bronquitis, ninguno de los cuales se categorizó como grave.

Uno de los sujetos de estudio, un hombre soltero de 33 años de edad, padecía psoriasis guttata al comienzo del estudio. De acuerdo con el diseño de estudio aleatorio, este sujeto por casualidad recibió J695 5 mg/kg por administración SC. Diez días antes de la administración del anticuerpo, el sujeto mostró solamente lesiones

populares discretas pequeñas en los brazos y las piernas. En el momento de la administración del anticuerpo, el sujeto presentó enrojecimiento aumentado, grosor de las placas eritematosas y aumento de hiperqueratosis. Una semana después de la administración de J695, el sujeto informó de una mejora en la afección cutánea, incluyendo aplanamiento de las lesiones y una reducción de la formación de escamas. Poco después de la segunda administración de J695 (IV 5 mg/kg), la piel del sujeto estaba totalmente limpia de lesiones psoriásicas, en ausencia de ningún tratamiento local. Las placas eritematosas cubiertas con escamas blancas reaparecieron junto con la eliminación esperada de J695 después de la segunda administración de anticuerpo.

Ejemplo 10: Comparación de J695 producido por dos líneas celulares CHO

Para expresión recombinante de J695, se introdujo un vector de expresión recombinante que codificaba tanto la cadena pesada de anticuerpo como la cadena ligera de anticuerpo en células CHO dhfr⁻ (Urlaub, G. y Chasin, LA. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4 216-4220) mediante transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo se unen cada uno operativamente a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, deriva dos de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador promotor de AdMLP/potenciador de CMV o un elemento regulador promotor de AdMLP/potenciador de SV40) para conducir niveles altos de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que posibilita la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación de metotrexato.

Se disolvieron ciento cincuenta microgramos de un vector de expresión que codifica las secuencias peptídicas del anticuerpo humano J695 en 2,7 ml de agua en un tubo cónico de 50 ml. Se añadieron trescientos μ l de CaCl_2 2,5 M y esta mezcla de ADN se añadió en gotas a 3 ml de solución salina tamponada con HEPES 2 x en un tubo cónico de 50 ml. Después de agitar en vórtex durante 5 segundos e incubarla a temperatura ambiente durante 20 minutos, se distribuyó 1 ml uniformemente sobre cada placa (aún en medio F12), y las placas se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Se retiró el líquido por aspiración y se añadieron 2 ml de DMSO 10% en F12 a cada placa. El choque con DMSO continuó durante 1 minuto, después de lo cual se diluyó DMSO mediante la adición de 5 ml de PBS a cada placa. Las placas se lavaron dos veces en PBS, seguido de la adición de 10 ml de alfa MEM, complementado con H/T y 5% de FBS (selectivo para células que expresaban DHFR) e incubación durante una noche a 37 °C. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 100 células por pocillo, y las placas se incubaron a 37 °C, CO_2 5% durante dos semanas, con un cambio de medio por semana.

Cinco días después del cambio de medio final, se diluyeron sobrenadantes de cultivo 1:50 y se ensayaron usando un ELISA específico para cadena de IgG gamma humana. Los clones que producían la señal de ELISA más alta se transfirieron de las placas de 96 pocillos a placas de 12 pocillos en Alfa MEM 1,5 ml/pocillo más suero dializado 5%. Después de 3 días, se realizó otro ELISA específico para cadena IgG gamma humana, y los 12 clones con la mayor actividad se dividieron en el alfa MEM más suero dializado al 5% y MTX 20 nM. La línea celular 031898 218 que creció en presencia de MTX 20 nM sin ninguna muerte celular aparente ni reducción en la tasa de crecimiento, produjo hIgG 1,8 μ g/ml en un ensayo de tres días. Los cultivos de T-25 de 031898 218, que crecían en medio que contenía MTX, produjeron una media de 11,9 μ g/ml de J695. La línea, designada ALP903, se adaptó a crecimiento en suspensión en condiciones sin suero, en las que produjo 7,5 pg de J695/célula/24 horas.

Se pasaron células ALP903, después de la selección inicial en medio alfa MEM/FBS 5%/MTX 20 nM, de nuevo en MTX 20 nM. Las células se cultivaron en selección de MTX 100 nM, seguido de pase en MTX 500 nM dos veces en los siguientes 30 días. En ese momento, el cultivo estaba produciendo 32 μ g de J695/ml/24 horas. El cultivo se subclonó limitando la dilución. El subclón 218-22 produjo 16,5 μ g/ml en una placa de 96 pocillos en 2 días y 50,3 μ g/ml de J695 en una placa de 12 pocillos en 2 días. El clon 218-22 se cultivó en alfa MEM/FBS dializado 5%/MTX 500 nM durante 38 días, seguido de adaptación a cultivo en agitación sin suero, como anteriormente. La productividad específica de célula media del cultivo de suspensión sin suero, designado ALP 905, fue 58 pg/célula/24 horas.

La primera línea celular usada para producir J695 (ALP 903) dio como resultado rendimientos más bajos del anticuerpo de cultivo que una segunda línea celular, ALP 905. Para asegurar que el J695 producido por ALP 905 era funcionalmente idéntico al producido a partir de ALP 903, ambos lotes de anticuerpos se evaluaron con respecto a afinidad de IL-12, con respecto a la capacidad para bloquear unión de IL-12 con receptores celulares, con respecto a la capacidad para inhibir la inducción de $\text{IFN-}\gamma$ por IL-12, y con respecto a la capacidad para inhibir la proliferación de blastos por PHA mediada por IL-12.

Las afinidades de los lotes de J695 ALP 903 y ALP 905 por IL-12 se determinaron midiendo las constantes de velocidad cinética de unión con IL-12 mediante estudios de resonancia de plasmón superficial (análisis de BIACore). La constante de velocidad de disociación (k_d) y la constante de velocidad de asociación (k_a) de los lotes de anticuerpo ALP903 y ALP905 para unión con rhIL-12 se determinaron en tres experimentos (como se ha descrito en el Ejemplo 3). La afinidad, K_d , de unión con IL-12 se calculó dividiendo la constante de velocidad de disociación por la constante de velocidad de asociación. K_d se calculó para cada experimento separado y después se promedió. Los resultados mostraron que los parámetros cinéticos determinados y afinidad de unión con rhIL-12 fueron muy

similares para lotes de J695 ALP 903 y ALP 905; la K_d calculada fue $1,19 \pm 0,22 \times 10^{-10}$ M para el lote ALP 903 y $1,49 \pm 0,47 \times 10^{-10}$ M para el lote ALP 905 (véase Tabla 13).

Se evaluó la capacidad de J695 derivada tanto de ALP 903 como de ALP 905 para bloquear unión de rhIL-12 con receptores de IL-12 en linfoblastos T activados por PHA humanos (véase Ejemplo 3). Cada muestra de J695 se ensayó a una concentración de partida de 1×10^{-8} con diluciones en serie 10 veces. El anticuerpo se preincubó durante 1 hora a 37°C con $[^{125}\text{I}]\text{-IL-12}$ humano 50 pM en tampón de unión. Se añadieron blastocitos de PHA a la mezcla de anticuerpo/ $[^{125}\text{I}]\text{-IL-12}$ humana y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La radiactividad unida a célula se separó de $[^{125}\text{I}]\text{-IL-12}$ libre por etapas de centrifugación y lavado, y se calculó el porcentaje de inhibición. Los valores de CI_{50} para J695 se determinaron a partir de las curvas de inhibición usando ajuste de curva de 4 parámetros y se confirmaron por dos experimentos independientes. Se llevaron a cabo incubaciones por duplicado. Los resultados de los dos lotes de J695 fueron muy similares (véase Tabla 13).

Se evaluó la capacidad de J695 de células tanto ALP 903 como ALP 905 para inhibir producción de $\text{IFN-}\gamma$ inducida por rhIL-12 por linfoblastos activados por PHA humanos *in vitro*. Se preincubaron diluciones en serie de J695 con rhIL-12 200 pg/ml durante 1 hora a 37°C . Se añadieron células de linfoblastos de PHA y se incubaron durante 18 horas a 37°C . Después de incubación, se retiró sobrenadante sin células y se determinó el nivel de $\text{IFN-}\gamma$ humano por ELISA. Los valores de CI_{50} de las curvas de inhibición se representaron frente a la concentración de anticuerpo usando ajuste de curva de 4 parámetros. Los resultados demuestran que la capacidad de los dos lotes para inhibir producción de $\text{IFN-}\gamma$ es muy similar.

El ensayo de proliferación de blastocitos por PHA *in vitro* se usó para medir la capacidad de neutralización de J695 ALP 903 y ALP 905 para rhIL-12. Se preincubaron diluciones en serie de J695 de cada tipo con IL-12 humano 230 pg/ml durante 1 hora a 37°C . A continuación se añadieron blastocitos de PHA y se incubaron durante 3 días a 37°C . Las células se marcaron después durante 6 horas con $[^3\text{H}]\text{-timidina}$ 1 $\mu\text{Ci/pocillo}$. Los cultivos se recogieron y se midió la incorporación de $[^3\text{H}]\text{-timidina}$. Se midió la proliferación no específica (fondo) en ausencia de rhIL-12. Se descubrió que los valores de CI_{50} para J695 ALP 903 y ALP 905 eran muy similares y se exponen en la Tabla 13.

La actividad de los anticuerpos J695 en la neutralización de actividad de rhIL-12, en el bloque de unión de IL-12 con receptores de superficie celular, y en la unión con rhIL-12 no disminuyó significativamente del lote ALP 903 al lote ALP 905, y por lo tanto los anticuerpos producidos a partir de estos dos tipos celulares diferentes eran equivalentes.

Tabla 13: Comparación de las Propiedades de los lotes de J695 ALP 903 y ALP 905

Anticuerpo	k_a , velocidad de asociación ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d , velocidad de disociación (s^{-1})	K_d (M)	CI_{50} del ensayo de RB (M)	CI_{50} del ensayo de blastos de PHA (M)	CI_{50} del ensayo de $\text{IFN-}\gamma$ (M)
J695ALP903	$3,75 \times 10^5$	$4,46 \times 10^{-5}$	$1,19 \times 10^{-10}$	$3,4 \times 10^{-11}$	$5,5 \times 10^{-12}$	$5,8 \times 10^{-12}$
J695ALP905	$3,91 \times 10^5$	$5,59 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^{-10}$	$3,0 \times 10^{-11}$	$4,4 \times 10^{-12}$	$4,3 \times 10^{-12}$

Listado de secuencias

<110> Jochen, Salfeld et al.

<120> Anticuerpos humanos que se unen a IL-12 y métodos de producción

<130> BBI-093CPPC

<140>

<141>

<150> 60/126.603

<151> 25 de marzo de 1999

<160> 675

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa en la posición 1 podría ser His o Ser

<220>

<223> Xaa en la posición 4 podría ser Tyr o His

5 <220>

<223> Xaa en la posición 6 podría ser Tyr, Asn o Thr

<400> 1

10 Xaa Gly Ser Xaa Asp Xaa
1 5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> Xaa en la posición 2 podría ser Ser o Thr

<220>

20 <223> Xaa en la posición 4 podría ser Asp o Glu

<220>

<223> Xaa en la posición 5 podría ser Ser, Arg o Lys

25 <220>

<223> Xaa en la posición 6 podría ser Ser, Gly o Tyr

<220>

<223> Xaa en la posición 7 podría ser Leu, Phe, Thr o Ser

30 <220>

<223> Xaa en la posición 8 podría ser Arg, Ser, Thr, Trp o His

<220>

35 <223> Xaa en la posición 9 podría ser Gly o Pro

<220>

<223> Xaa en la posición 10 podría ser Ser, Thr, Ala o Leu

40 <220>

<223> Xaa en la posición 11 podría ser Arg, Ser, Met, Thr o Leu

<220>

<223> Xaa en la posición 12 podría ser Val, Ile, Thr, Met o Leu

45 <400> 2

Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 3

<211> 17

50 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pha Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

55 <210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

60 <220>

<223> Xaa en la posición 1 podría ser Gly o Tyr

<220>

<223> Xaa en la posición 3 podría ser Asp o Ser

5 <220>

<223> Xaa en la posición 4 podría ser Gln o Asn

<400> 4

Xaa Asn Xaa Xaa Arg Pro Ser
1 5

10 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> Xaa representa Ser o Glu

<400> 5

Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Gly Met His
1 5

20 <210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <220>

<223> Xaa en la posición 1 podría ser Ser o Thr

<220>

30 <223> Xaa en la posición 3 podría ser Ser o Gly

<220>

<223> Xaa en la posición 4 podría ser Arg o Ser

35 <220>

<223> Xaa en la posición 8 podría ser Gly o Val

<220>

<223> Xaa en la posición 9 podría ser Ser o Ala

40 <220>

<223> Xaa en la posición 10 podría ser Asn, Gly o Tyr

<220>

45 <223> Xaa en la posición 11 podría ser Thr o Asp

<220>

<223> Xaa en la posición 13 podría ser Lys o His

50 <400> 6

Xaa Gly Xaa Xaa Ser Asn Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa
1 5 10

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa en la posición 6 podría ser Gln o Glu

60 <220>

<223> Xaa en la posición 16 podría ser Arg o Gly

$\langle 220 \rangle$

<223> Xaa en la posición 31 podría ser Ser o Glu

$\langle 220 \rangle$

5 <223> Xaa en la posición 84 podría ser Lys o Asn

$\langle 220 \rangle$

<223> Xaa en la posición 97 podría ser Thr, Ala o Lys

10 <220>

<223> Xaa en la posición 98 podría ser Thr o Lys

<220>

<223> Xaa en la posición 99 podría ser Ser o His

15

<220>
<223> Xaa en la posición 102 podría ser Tyr o His

$\langle 220 \rangle$

20 <223> Xaa en la posición 104 podría ser Tyr, Asn o Thr

<400> 7

```

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

```

25 $\langle 210 \rangle$ 8

$\langle 211 \rangle$ 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<220>
<223> Xaa en la posición 1 podría ser Ser o Gln

<220>

35 <223> Xaa en la posición 2 podría ser Tyr o Ser

$\langle 220 \rangle$

<223> Xaa en la posición 13 podría ser Thr o Ala

40 <220>

<223> Xaa en la posición 23 y 91 podría ser Ser o Thr

$\langle 220 \rangle$

<223> Xaa en la posición 25 podría ser Gly o Ser

45

<220>
<223> Xaa en la posición 26 podría ser Arg o Ser

<220>
 <223> Xaa en la posición 30 podría ser Gly o Val
 5 <220>
 <223> Xaa en la posición 31 podría ser Ser o Ala
 <220>
 <223> Xaa en la posición 35 podría ser Lys o His
 10 <220>
 <223> Xaa en la posición 51 podría ser Gly o Lys
 <220>
 15 <223> Xaa en la posición 54 podría ser Gln o Asn
 <220>
 <223> Xaa en la posición 79 podría ser Val o Leu
 20 <220>
 <223> Xaa en la posición 93 podría ser Asp o Glu
 <220>
 <223> Xaa en la posición 94 podría ser Ser, Arg o Lys
 25 <220>
 <223> Xaa en la posición 95 podría ser Ser, Gly o Tyr
 <220>
 30 <223> Xaa en la posición 96 podría ser Leu, Phe, Thr o Ser
 <220>
 <223> Xaa en la posición 97 podría ser Arg, Ser, Thr, Trp o His
 35 <220>
 <223> Xaa en la posición 98 podría ser Gly o Pro
 <220>
 <223> Xaa en la posición 99 podría ser Ser, Thr, Ala o Leu
 40 <220>
 <223> Xaa en la posición 100 podría ser Arg, Ser, Met, Thr o Leu
 <220>
 45 <223> Xaa en la posición 101 podría ser Val, Ile, Thr, Met o Leu
 <220>
 <223> Xaa en la posición 32 podría ser Asn, Gly o Tyr
 50 <220>
 <223> Xaa en la posición 33 podría ser Thr o Asp
 <220>
 <223> Xaa en la posición 53 podría ser Asp o Ser
 55 <400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa en la posición 2 podría ser Gly, Val, Cys o His

10 <220>

<223> Xaa en la posición 3 podría ser Ser o Thr

<220>

<223> Xaa en la posición 4 podría ser His, Thr, Val, Arg, o Ile

15

<220>

<223> Xaa en la posición 5 podría ser Asp o Ser

<220>

20 <223> Xaa en la posición 6 podría ser Asn, Lys, Ala, Thr, Ser, Phe, Trp, o His

<400> 9

```

His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1          5

```

25 <210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <220>

<223> Xaa en la posición 4 podría ser Asp o Ser

<220>

<223> Xaa en la posición 5 representa cualquier aminoácido

35

<220>

<223> Xaa en la posición 6 podría ser Gly, Asp, Gln, Leu, Phe, Arg, His, Asn o Tyr

<400> 10

40

```

Gln Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Thr His Pro Ala Leu Leu
 1          5          10

```

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Xaa en la posición 1 podría ser Phe, Thr o Tyr

<220>
 5 <223> Xaa en la posición 3 podría ser Arg o Ala

<220>
 <223> Xaa en la posición 5 podría ser Asp, Ser, Glu o Ala

10 <220>
 <223> Xaa en la posición 6 podría ser Gly o Arg

<220>
 15 <223> Xaa en la posición 8 representa cualquier aminoácido

<220>
 <223> Xaa en la posición 10 podría ser Tyr o Glu

<400> 11

20

Xaa	Ile	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Ser	Xaa	Lys	Xaa	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 12
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Xaa en la posición 1 podría ser Gly, Tyr, Ser, Thr, Asn o Gln

30 <400> 12

Xaa	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 13
 35 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 40 <223> Xaa en la posición 4 y 5 representa cualquier aminoácido

<220>
 <223> Xaa en la posición 6 podría ser Tyr o His

45 <220>
 <223> Xaa en la posición 7 podría ser Gly, Met, Ala, Asn o Ser

<400> 13

Phe	Thr	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Met	His
1				5				

50

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Xaa en la posición 9 podría ser Ser, Cys, Arg, Asn, Asp o Thr

60 <220>

<223> Xaa en la posición 10 podría ser Asn, Met o Ile

<220>

<223> Xaa en la posición 11 podría ser Thr, Tyr, Asp, His, Lys o Pro

5

<400> 14

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Xaa Xaa Xaa Val Lys
1 5 10

10

<210> 15

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<220>

<223> Xaa en la posición 30 podría ser Ser o Glu

<220>

<223> Xaa en la posición 83 podría ser Lys o Asn

20

<220>

<223> Xaa en la posición 5 podría ser Gln o Glu

<400> 15

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

25

Ser Ser

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

30

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa en la posición 1 podría ser Ser o Gln

35

<220>

<223> Xaa en la posición 2 podría ser Tyr o Ser

<220>

<223> Xaa en la posición 13 podría ser Thr o Ala

40

<220>

<223> Xaa en la posición 25 podría ser Gly o Ser

<220>

45

<223> Xaa en la posición 51 y 95 podría ser Gly o Tyr

<220>

<223> Xaa en la posición 79 podría ser Val o Leu

<400> 16

5

```

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

```

<210> 17

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

15

```

His Gly Ser His Asp Asn
 1          5

```

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 18

25

```

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1          5          10

```

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 19

```

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1          5          10          15
Gly

```

35

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 20

		Gly	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser									
		1				5											
5	<210> 21																
	<211> 9																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
	<400> 21																
10		Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His							
		1				5											
	<210> 22																
	<211> 13																
	<212> PRT																
15	<213> Homo sapiens																
	<400> 22																
20		Ser	Gly	Gly	Arg	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Thr	Val	Lys			
		1				5					10						
	<210> 23																
	<211> 115																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
25	<400> 23																
		Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
		1				5					10					15	
		Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
					20					25					30		
		Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35						40					45			
		Ala	Phe	Ile	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50					55					60				
		Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
			65				70					75					80
		Leu	Gln	Met	Lys	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90						95	
		Lys	Thr	His	Gly	Ser	His	Asp	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr
					100					105						110	
		Val	Ser	Ser													
					115												
30	<210> 24																
	<211> 112																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
35	<400> 24																

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

<210> 25
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

His Gly Ser His Asp Asn
 1 5

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 26

Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 27

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Tyr Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 29

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 1 5

10 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 30

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Lys
 1 5 10

20 <210> 31
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 31

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

30 <210> 32
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

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

10
 <210> 34
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 34

```

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

Arg Gly Ser Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
          100           105           110

```

<210> 35
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 35

```

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

Val Ser Ser
          115

```

<210> 36
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Xaa en la posición 32 representa Gly o Tyr

 20 <400> 36

```

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

```

<210> 37
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37

```

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

```

10
 <210> 38
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 38

```

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

```

<210> 39
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

```

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

```

10
 <210> 40
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 40

```

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

```

<210> 41
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 41

```

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

```

10

 <210> 42
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 42

```

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

```

<210> 43
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

```

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

```

<210> 44
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 44

```

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

```

<210> 45
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 45

```

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

```

<210> 46
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 46

```

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

```

<210> 47
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47

```

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

```

10
 <210> 48
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 48

```

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

```

<210> 49
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49

```

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

```

10
 <210> 50
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 50

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

<210> 51
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51

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

<210> 52
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 52

```

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

```

<210> 53
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

```

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

```

Val Ser Ser
 115

10
 <210> 54
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 54

```

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

```

<210> 55
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55

```

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

```

10
 <210> 56
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 56

```

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

```

<210> 57
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57

```

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

```

10
 <210> 58
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 58

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

<210> 59
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59

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

10
 <210> 60
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 60

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln

```

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

```

<210> 61
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 61

```

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

```

10

 <210> 62
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 62

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
      1           5           10           15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn
      20           25           30

```

```

Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
    35              40              45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Val Gln
    65              70              75              80

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

His Pro Leu Thr Ile Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
    100             105             110

```

<210> 63

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
    1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
    20              25              30

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

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50              55              60

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

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

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
    100             105             110

Val Ser Ser
    115

```

10

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 64

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
    1              5              10              15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn
    20              25              30

Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
    35              40              45

```

```

Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50          55          60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Val Gln
 65          70          75          80
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ser
          85          90          95
His Pro Ala Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
          100          105          110

```

<210> 65
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 65

```

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

```

10
 <210> 66
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 66

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1          5          10          15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn
          20          25          30
Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
          35          40          45
Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
          50          55          60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Val Gln

```

65		70		75		80									
Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Arg	Gly	Thr
			85					90						95	
His	Pro	Leu	Thr	Met	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly
		100						105					110		

<210> 67

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

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

10

<210> 68

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 68

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

20

<210> 69
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 69

```

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

```

10 <210> 70
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 70

```

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

```

20 <210> 71
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 71

```

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

```

<210> 72
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 72

```

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

```

10

 <210> 73
 <211> 115
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 73

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

<210> 74
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 74

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

10 <210> 75
 <211> 115
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 75

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

<210> 76
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 76

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

<210> 77
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 77

Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr
 1 5

<210> 78
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

His Gly Ser His Asp Asn
1 5

5 <210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 79

His Gly Ser Tyr Asp Tyr
1 5

15 <210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 80

Arg Arg Arg Ser Asn Tyr
1 5

25 <210> 81
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ser Gly Ser Ile Asp Tyr
1 5

30 <210> 82
<211> 6
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 82

His Gly Ser His Asp Asp
1 5

40 <210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 83

His Gly Ser His Asp Asn
1 5

50 <210> 84
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

55 Thr Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly
1 5 10

<210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 85

Ala Lys His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 1 5 10

10 <210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 86

Thr Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Ser Gln Gly
 1 5 10

20 <210> 87
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 87

Thr Thr His Gly Ser His Asp Thr Trp Gly Gln Gly
 1 5 10

30 <210> 88
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 98

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 1 5 10

35 <210> 89
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 89

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly His Gly
 1 5 10

45 <210> 90
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 90

Thr Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Ser Gln Gly
 1 5 10

55 <210> 91
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 91

Thr Thr His Arg Ser His Asn Asn Trp Gly Gln Gly
1 5 10

<210> 92

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

10

Thr Thr His Gly Ser His Asp Asn
1 5

<210> 93

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Thr Thr His Gly Ser His Asp Thr
1 5

20

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 94

Thr Lys His Gly Ser His Asp Asn
1 5

30

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 95

Thr Thr Gln Gly Arg His Asp Asn
1 5

40

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 96

Lys Thr Arg Gly Arg His Asp Asn
1 5

50

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

55

Thr Thr His Gly Ser His Asp Lys
1 5

<210> 98
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 98

Thr Thr His Gly Ser His Asp Asp
 1 5

10 <210> 99
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 99

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn
 1 5

<210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 100
 25

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn
 1 5

<210> 101
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 101

Thr Thr His Gly Ser His Asp Asn
 1 5

<210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 102

Thr Thr Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr
 1 5

45 <210> 103
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 103

Thr Thr His Gly Ser His Asp Asn
 1 5

55 <210> 104
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Thr Thr His Gly Ser Gln Asp Asn
1 5

5

<210> 105

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Thr His Gly Ser Gln Asp Asn
1 5

15

<210> 106

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 106

His Gly Ser Gln Asp Thr
1 5

25

<210> 107

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 107

Ser Gly Ser Tyr Asp Tyr
1 5

35

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

40

His Gly Ser Gln Asp Asn
1 5

<210> 109

<211> 9

45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Cys Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn
1 5

50

<210> 110

<211> 12

<212> PRT

55

<213> Homo sapiens

<400> 110

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Gly Ser Arg Val

1 5 10

5 <210> 111
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 111

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val
1 5 10

15 <210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 112

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Gly Ser Arg Val
1 5 10

25 <210> 113
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 113

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Thr Gly Ser Arg Val
1 5 10

35 <210> 114
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Trp Gly Ser Arg Val
1 5 10

40 <210> 115
<211> 12
<212> PRT
45 <213> Homo sapiens

<400> 115

Gln Thr Tyr Asp Ile Ser Glu Ser Gly Ser Arg Val
1 5 10

50 <210> 116
<211> 12
<212> PRT
55 <213> Homo sapiens

<400> 116

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val
1 5 10

5 <210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 117

Gln Thr Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val
1 5 10

15 <210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 118

Gln Thr Tyr Asp Lys Gly Phe Thr Gly Ser Ser Val
1 5 10

25 <210> 119
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

30 Gln Ser Tyr Asp Arg Arg Phe Thr Gly Ser Arg Val
1 5 10

<210> 120
<211> 12
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 120

Gln Ser Tyr Asp Trp Asn Phe Thr Gly Ser Arg Val
1 5 10

40 <210> 121
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 121

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val
1 5 10

50 <210> 122
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 122

		Gln Ser Tyr Asp Asn Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val
		1 5 10
	<210> 123	
	<211> 12	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 123	
		Gln Ser Tyr Asp Asn Ala Val Thr Ala Ser Lys Val
		1 5 10
10	<210> 124	
	<211> 12	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 124	
		Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val
		1 5 10
20	<210> 125	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 125	
		Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Trp Gly Thr Arg Val
		1 5 10
30	<210> 126	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 126	
		Gln Ser Tyr Asp Arg Asp Phe Thr Gly Ser Arg Val
		1 5 10
	<210> 127	
40	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 127	
45		Gln Ser Tyr Glu Arg Gly Phe Thr Gly Ser Met Val
		1 5 10
	<210> 128	
	<211> 12	
50	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 128	
		Gln Ser Tyr Asp Asn Gly Phe Thr Gly Ala Arg Val
		1 5 10
55		

<210> 129
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 129

Gln Ser Tyr Asp Arg Arg Phe Thr Gly Ser Arg Val
 1 5 10

10 <210> 130
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 130

Gln Thr Tyr Asp Lys Gly Phe Thr Gly Ser Ser Val
 1 5 10

<210> 131
 20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 131
 25

Gln Ser Tyr Asp Arg Asp Phe Thr Gly Thr Arg Val
 1 5 10

<210> 132
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 132

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Tyr Gly Ser Met Val
 1 5 10

<210> 133
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 133

Gln Thr Tyr Asp Lys Gly Phe Thr Gly Ser Ser Val
 1 5 10

45 <210> 134
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 134

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ala Arg Val
 1 5 10

55 <210> 135
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 135

Gln Ser Tyr Glu Arg Gly Phe Thr Gly Ala Arg Val
1 5 10

5 <210> 136
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 136

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
1 5 10

15 <210> 137
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 137

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Phe Lys Val Phe
1 5 10

25 <210> 138
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Val Ser Ala Tyr Val Phe
1 5 10

30 <210> 139
<211> 13
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 139

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Thr Val Thr Lys Val Phe
1 5 10

40 <210> 140
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 140

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Tyr Thr Ala Ser Arg Val Phe
1 5 10

50 <210> 141
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 141

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Lys Val Phe
1 5 10

<210> 142
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 142

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Thr Gly Phe Arg Val Phe
 1 5 10

10 <210> 143
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 143

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Tyr Lys Val Phe
 1 5 10

20 <210> 144
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 144

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Thr Gly Tyr Arg Leu Phe
 1 5 10

30 <210> 145
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 145

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Asp Tyr Lys Val Phe
 1 5 10

35 <210> 146
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 146

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Pro Arg Leu Phe
 1 5 10

45 <210> 147
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 147

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10

55 <210> 148

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 148

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ala Arg Val Trp
 1 5 10
 <210> 149
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 149

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Tyr Arg Val Phe
 1 5 10
 15 <210> 150
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 150

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Pro Arg Val Phe
 1 5 10
 <210> 151
 25 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 151
 30

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Met Thr Ser Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 <210> 152
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 152

 Gln Ser Tyr Asp Arg Asp Ser Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 40
 <210> 153
 <211> 13
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 153

 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 50 <210> 154
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 154

		His Ser Tyr Asp Ser Asp Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
		1 5 10
5	<210> 155	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 155	
10		His Ser Ser Glu Ser Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
		1 5 10
	<210> 156	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 156	
20		His Ser Tyr Asp Asn Arg Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
		1 5 10
	<210> 157	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 157	
30		His Ser Tyr Asp Ser Arg Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
		1 5 10
	<210> 158	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 158	
40		Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
		1 5 10
	<210> 159	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 159	
45		Gln Ser Tyr Asp Thr Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
		1 5 10
	<210> 160	
	<211> 13	
	<212> PRT	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 160	
55		His Ser Tyr Asp Ser Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
		1 5 10
	<210> 161	
	<211> 13	

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 161
 5
 Gln Ser Tyr Asp Thr Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 <210> 162
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 162
 His Ser Tyr Asp Thr Lys Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 15
 <210> 163
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 163
 His Ser Ser Asp Ser Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 25
 <210> 164
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 164
 Gln Ser Tyr Asp Ser Asp Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 35 <210> 165
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 165
 His Ser Tyr Glu Ser Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 45 <210> 166
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 166
 50
 Gln Ser Tyr Asp Ala Pro Trp Ser Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 55 <210> 167
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 167

	Gln Ser Tyr Asp Ser Asp Phe Thr Gly Ser Lys Val Phe
	1 5 10
	<210> 168
	<211> 13
5	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 168
	His Thr Asn Asp Ser Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
10	1 5 10
	<210> 169
	<211> 13
	<212> PRT
15	<213> Homo sapiens
	<400> 169
	His Ser Tyr Asp Thr Arg Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
	1 5 10
20	<210> 170
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
25	<400> 170
	Gln Ser Tyr Asp Met Arg Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
	1 5 10
30	<210> 171
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
35	<400> 171
	His Ser Ser Asp Ser Asp Ser Thr Gly Ser Arg Val Phe
	1 5 10
40	<210> 172
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 172
45	
	Gln Ser Tyr Asn Thr Asp Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
	1 5 10
	<210> 173
	<211> 13
50	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 173
	Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
55	1 5 10
	<210> 174

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 174

 His Ser Tyr Asp Met Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10

 <210> 175
 10 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 175
 15

 His Ser Tyr Asp Asn Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10

 <210> 176
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 176

 His Ser His Asp Arg Asp Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe

 1 5 10
 25

 <210> 177
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 177

 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Gly Ser Arg Val
 1 5 10
 35

 <210> 178
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40

 <400> 178

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ile His Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10

 45 <210> 179
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 50 <400> 179

 Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Phe Pro Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10

 <210> 180

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 180

 Gln Ser Tyr Asp Ile Gly Ser Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10

 <210> 181
 10 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 181
 15

 Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Leu Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10

 <210> 182
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 182

 Gln Ser Tyr Asp Ile Gly Met Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 25

 <210> 183
 <211> 13
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 183

 Gln Ser Tyr Asp Ile Gly Leu Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10
 35

 <210> 184
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40

 <400> 184

 Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Val Thr Gly Ser Arg Val Phe
 1 5 10

 45 <210> 185
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 50 <400> 185

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Thr Ala Ser Arg Val Phe
 1 5 10

 <210> 186
 55 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 186

Gln Ser Tyr Asp Thr Gly Leu Thr Gly Ser Arg Val Phe
1 5 10

5 <210> 187
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 187

Gln Ser Tyr Asp Thr Ala Leu Thr Gly Ser Arg Val Phe
1 5 10

15 <210> 188
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 188

Gln Ser Tyr Asp Ile Arg Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
1 5 10

25 <210> 189
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 189

Gln Ser Tyr Asp Ile Arg Ser Thr Gly Ser Arg Val Phe
1 5 10

30 <210> 190
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 190

Gln Ser Tyr Asp Asn Arg Leu Thr Gly Ser Arg Val Phe
1 5 10

40 <210> 191
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 191

Gln Ser Tyr Glu Thr Ser Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
1 5 10

50 <210> 192
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 192

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Thr Gly Ser Arg Val Phe
1 5 10

55

	<210> 193	
	<211> 13	
	<212> PRT	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 193	
		Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Phe Thr Ala Ser Arg Val Phe
		1 5 10
10	<210> 194	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 194	
		Gln Thr Tyr Asp Lys Gly Phe Thr Gly Ser Ser Val Phe
		1 5 10
20	<210> 195	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 195	
		Gln Ser Tyr Asp Asn Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
		1 5 10
	<210> 196	
30	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 196	
35		
		Gln Ser Tyr Asp Thr Gly Phe Thr Lys Ser Arg Val Phe
		1 5 10
	<210> 197	
40	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 197	
		Gln Ser Tyr Asp Ser Asp Val Thr Gly Ser Arg Val Phe
45		1 5 10
	<210> 198	
	<211> 13	
	<212> PRT	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 198	
		Gln Ser Tyr Asp Ala Gly Phe Thr Gly Ser Arg Val Phe
55		1 5 10
	<210> 199	
	<211> 12	
	<212> PRT	

<213> Homo sapiens

<400> 199

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ser Met Leu
1 5 10

5

<210> 200

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 200

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Thr Pro Arg Pro Met
1 5 10

15

<210> 201

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 201

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Arg Asn Pro Ala Leu Thr
1 5 10

25

<210> 202

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 202

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Trp Leu His
1 5 10

35

<210> 203

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

40

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Asn Ser Pro Ala Thr Val
1 5 10

45

<210> 204

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Phe Pro Ser Pro Gln
1 5 10

50

<210> 205

<211> 12

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<400> 205

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Asn Pro Ser Ala Thr
1 5 10

5 <210> 206
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 206

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Lys Ser Asn Lys Met Leu
1 5 10

15 <210> 207
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 207

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly His Thr Ala His Leu Tyr
1 5 10

25 <210> 208
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 208

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Gln Thr Pro Ser Ile Thr
1 5 10

30
35 <210> 209
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 209

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu

1 5 10

40
45 <210> 210
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 210

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ile Thr Pro Gly Leu Ala
1 5 10

50 <210> 211
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 211

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Gln Pro His Ala Val Leu
1 5 10

5 <210> 212
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 212

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Asn Ser Pro Ile Pro Thr
1 5 10

15 <210> 213
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 213

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Pro Asn Asn Ser Phe
1 5 10

25 <210> 214
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 214

Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Val Asp Pro Gly Pro Tyr
1 5 10

30 <210> 215
<211> 12
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 215

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Arg Pro Arg His Ala Leu
1 5 10

40 <210> 216
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 216

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Pro Tyr His Pro Ile Arg
1 5 10

50 <210> 217
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 217

		Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Pro His Thr Gln Pro Thr
		1 5 10
5	<210> 218	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 218	
10		Gln Ser Tyr Asp Arg Gly His Asn Asn Phe Ser Pro
		1 5 10
	<210> 219	
	<211> 12	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 219	
20		Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Pro Thr His Leu Pro His
		1 5 10
	<210> 220	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 220	
30		Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Pro Ser Tyr Pro Thr
		1 5 10
	<210> 221	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 221	
40		Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Thr Ser Asn Leu Leu Pro
		1 5 10
	<210> 222	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 222	
50		Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Asp Ser Asn His Asp Leu
		1 5 10
	<210> 223	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 223	
55		Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Pro Arg Leu Thr His
		1 5 10

<210> 224
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 224

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ile Pro Thr Ser Tyr Leu
 1 5 10

10 <210> 225
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 225

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Arg Val Gln Ala Pro
 1 5 10

20 <210> 226
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 226

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Leu Ser Asp Ser Pro Leu
 1 5 10

30 <210> 227
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 227

Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Ser Leu Arg Arg Ile Leu
 1 5 10

35 <210> 228
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 228

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Pro Ala Arg Thr Ser Pro
 1 5 10

45 <210> 229
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 229

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Arg Ala Ala His Pro Gln
 1 5 10

55 <210> 230
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 230
 5
 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Gln Pro Ala Asx Ile
 1 5 10
 <210> 231
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 231
 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Thr Met Ile
 1 5 10
 <210> 232
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 232
 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Arg Ile Pro Ala Asx Thr
 1 5 10
 25 <210> 233
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 233
 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Val Pro Ala
 1 5 10
 35 <210> 234
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 234
 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ser Asx Pro Ile Pro Ala
 1 5 10
 <210> 235
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 235
 50
 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Val Pro Ala
 1 5 10
 <210> 236
 <211> 12
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 236

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Thr Met Tyr
1 5 10

5 <210> 237
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 237

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly His His Tyr Thr Thr Phe
1 5 10

15 <210> 238
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 238

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ser His Pro Ala Ala Glu
1 5 10

25 <210> 239
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 239

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Ile Pro Ser Ile Glu
1 5 10

30 <210> 240
<211> 12
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 240

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ser Ser Pro Ala Ile Met
1 5 10

40 <210> 241
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
45 <400> 241

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ile Trp Pro Asn Leu Asn
1 5 10

50 <210> 242
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
55 <400> 242

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Asn Leu Asr

1 5 10

<210> 243
<211> 12
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 243

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ser Ile Ser
1 5 10

10

<210> 244
<211> 12
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 244

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ser Ala Pro Met Ile Asn
1 5 10

20

<210> 245
<211> 12
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 245

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly His His Pro Ala Met Ser
1 5 10

30 <210> 246
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 246

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ser Ile Thr
1 5 10

40 <210> 247
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 247
45

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Asp Pro Ala Ile Val
1 5 10

<210> 248
<211> 12
50 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 248

	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 249
	<211> 12
5	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 249
10	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ser His Pro Ala Leu Thr
	1 5 10
	<210> 250
	<211> 12
	<212> PRT
15	<213> Homo sapiens
	<400> 250
20	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Thr Pro Ala Pro Glu
	1 5 10
	<210> 251
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
25	
	<400> 251
30	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ser His Pro Thr Leu Ile
	1 5 10
	<210> 252
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
35	
	<400> 252
40	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ser Met Leu
	1 5 10
	<210> 253
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
45	
	<400> 253
50	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Thr Pro Arg Pro Met
	1 5 10
	<210> 254
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 254
55	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Arg Leu Pro Ala Gln Thr
	1 5 10

<210> 255
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 255

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Leu Thr Ile
 1 5 10

10 <210> 256
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 256

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Gln Thr Pro Ser Ile Thr
 1 5 10

<210> 257
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 257
 25

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Phe Gln Met Tyr
 1 5 10

<210> 258
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 258

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Arg Asn Pro Ala Leu Thr
 1 5 10

<210> 259
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 259

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Leu Thr Met
 1 5 10

45 <210> 260
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 260

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Leu Thr Met
 1 5 10

55 <210> 261
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 261

Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Arg	Val
1				5					10		

5

<210> 262

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 262

Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Gly	Phe	Thr	Gly	Ser	Arg	Val
1				5					10		

15

<210> 263

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 263

Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Arg	Val
1				5					10		

25

<210> 264

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 264

Gln	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Ala	Ser	Arg	Val
1				5					10		

35

<210> 265

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 265

40

Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	His	Met	Pro	Ile	Ser	Arg	Val
1				5					10		

<210> 266

<211> 12

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 266

Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Arg	Val
1				5					10		

50

<210> 267

<211> 12

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<400> 267

	Gln Ser Tyr Pro Asn Ser Tyr Pro Ile Ser Arg Val
	1 5 10
5	<210> 268 <211> 10 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 268
10	Gln Ser Tyr Ile Arg Ala Pro Gln Gln Val
	1 5 10
15	<210> 269 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 269
20	Gln Ser Tyr Leu Lys Ser Arg Ala Phe Ser Arg Val
	1 5 10
25	<210> 270 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 270
30	Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Phe Thr Gly Ser Arg Val
	1 5 10
35	<210> 271 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 271
40	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Met Val
	1 5 10
	<210> 272 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 272
45	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Met Val
	1 5 10
50	<210> 273 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 273
55	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Phe Asp Gly
	1 5 10

<210> 274
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 274

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Ala Pro Ala Leu Ser
 1 5 10

10 <210> 275
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 275

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Ser Tyr Pro Ala Leu Arg
 1 5 10

20 <210> 276
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 276

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Asn Trp Pro Asn Ser Asn
 1 5 10

30 <210> 277
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 277

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Ala Pro Ser Leu Leu
 1 5 10

35 <210> 278
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 278

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Met Val
 1 5 10

45 <210> 279
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 279

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr Thr Pro Arg Ile Arg
 1 5 10

55 <210> 280

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 280

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Met Val
 1 5 10

 <210> 281
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 281
 15

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Met Val
 1 5 10

 <210> 282
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 282

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Met Ile Pro Ala Leu Thr
 1 5 10
 25
 <210> 283
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 283

 Gln Ser Tyr Asp Arg Asn Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10
 35
 <210> 284
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 284

 Gln Ser Tyr Asp Arg Phe Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

 45 <210> 285
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 285

 Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

 55 <210> 286
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 286

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
5 1 5 10

<210> 287

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 287

Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20
<400> 288

Phe Thr Phe Glu Ser Tyr Gly Met His
1 5

25 <210> 289

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 289

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 290

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 290

40

Phe Thr Phe Tyr Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 291

$\langle 211 \rangle$ 9

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 291

50 Phe Thr Phe His Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 292

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<400> 292

		Phe Thr Phe Lys Ser Tyr Gly Met His
		1 5
	<210> 293	
	<211> 9	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 293	
10		Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met His
		1 5
	<210> 294	
	<211> 9	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 294	
20		Phe Thr Phe Asn Ser Tyr Gly Met His
		1 5
	<210> 295	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 295	
30		Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Met His
		1 5
	<210> 296	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 296	
40		Phe Thr Phe Gly Ser Tyr Gly Met His
		1 5
	<210> 297	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 297	
45		Phe Thr Phe Val Ser Tyr Gly Met His
		1 5
	<210> 298	
	<211> 9	
50	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 298	
55		Phe Thr Phe Ile Ser Tyr Gly Met His
		1 5
	<210> 299	

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 299

 Phe Thr Phe Trp Ser Tyr Gly Met His
 1 5

 <210> 300
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 300
 15

 Phe Thr Phe Ser Glu Tyr Gly Met His
 1 5

 <210> 301
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 301

 Phe Thr Phe Ser Cys Tyr Gly Met His
 1 5
 25

 <210> 302
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 302

 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 35

 <210> 303
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40

 <400> 303

 Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr Gly Met His
 1 5
 45

 <210> 304
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50

 <400> 304

 Phe Thr Phe Ser His Tyr Gly Met His
 1 5
 55 <210> 305
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 305

5

Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly Met His
1 5

<210> 306

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 306

Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His
1 5

15

<210> 307

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 307

Phe Thr Phe Ser Gln Tyr Gly Met His
1 5

25

<210> 308

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 308

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Met His

1

5

<210> 309

35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 309

40

Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Gly Met His
1 5

<210> 310

<211> 9

45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 310

Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Gly Met His
1 5

50

<210> 311

<211> 9

<212> PRT

55

<213> Homo sapiens

<400> 311

Phe Thr Phe Ser Ser Glu Gly Met His
1 5

5 <210> 312
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 312

Phe Thr Phe Ser Ser Cys Gly Met His
1 5

15 <210> 313
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 313

Phe Thr Phe Ser Ser Ser Gly Met His
1 5

25 <210> 314
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 314

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5

30 <210> 315
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 315

Phe Thr Phe Ser Ser His Gly Met His
1 5

40 <210> 316
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 316

Phe Thr Phe Ser Ser Arg Gly Met His
1 5

50 <210> 317
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 317

Phe Thr Phe Ser Ser Asn Gly Met His
1 5

<210> 318
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 318

Phe Thr Phe Ser Ser Thr Gly Met His
 1 5

10 <210> 319
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 319

Phe Thr Phe Ser Ser Ala Gly Met His
 1 5

20 <210> 320
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 320

Phe Thr Phe Ser Ser Val Gly Met His
 1 5

30 <210> 321
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 321

Phe Thr Phe Ser Ser Leu Gly Met His
 1 5

35 <210> 322
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 322

Phe Thr Phe Ser Ser Ile Gly Met His
 1 5

45 <210> 323
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 323

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met His
 1 5

55 <210> 324
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 324

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu Met His
1 5

5 <210> 325
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 325

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Cys Met His
1 5

15 <210> 326
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 326

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met His
1 5

25 <210> 327
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 327

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr Met His
1 5

35 <210> 328
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 328

40 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 329
<211> 9
<212> PRT
45 <213> Homo sapiens

<400> 329

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5

50 <210> 330
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 330

		Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
		1 5
	<210> 331	
	<211> 9	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 331	
10		Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met His
		1 5
	<210> 332	
	<211> 9	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 332	
20		Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Met Met His
		1 5
	<210> 333	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 333	
30		Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met His
		1 5
	<210> 334	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 334	
40		Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Pro Met His
		1 5
	<210> 335	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 335	
45		Glu Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
		1 5 10 15
	Gly	
	<210> 336	
	<211> 17	
50	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 336	

Cys Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 337

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 337

Tyr Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 338

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 338

His Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 339

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 339

Lys Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 340

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 340

Asn Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40

<210> 341

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 341

Gln Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 342

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 342

Thr Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 343

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 343

Leu Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 344

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 344

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 345

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 345

Phe Ile Glu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40

<210> 346

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 346

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 347

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 347

Phe Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 348

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 348

Phe Ile His Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 349

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 349

Phe Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 350

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 350

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 351

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 351

Phe Ile Gln Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 352
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 352

Phe Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

10 <210> 353
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 353

Phe Ile Gly Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

20 <210> 354
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 354

Phe Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

30 <210> 355
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 355

Phe Ile Val Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

35 <210> 356
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 356

Phe Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

45 <210> 357
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 357

Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 358

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 358

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15

<210> 359

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 359

Phe Ile Arg Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 360

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 360

Phe Ile Arg Tyr Ser Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 361

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 361

40

Phe Ile Arg Tyr Tyr Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 362

<211> 17

<212> PRT

45

<213> Homo sapiens

<400> 362

Phe Ile Arg Tyr Lys Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 363

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 363

10

Phe Ile Arg Tyr Arg Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 364

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 364

Phe Ile Arg Tyr Asn Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

20

<210> 365

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 365

Phe Ile Arg Tyr Gln Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

30

<210> 366

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 366

Phe Ile Arg Tyr Thr Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

40

<210> 367

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 367

Phe Ile Arg Tyr Ala Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 368

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 368

Phe Ile Arg Tyr Val Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 369

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 369

Phe Ile Arg Tyr Leu Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 370

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 370

Phe Ile Arg Tyr Ile Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

30

<210> 371

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 371

Phe Ile Arg Tyr Phe Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 372

40

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 372

45

Phe Ile Arg Tyr Asp Asp Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 373
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 373

Phe Ile Arg Tyr Asp Glu Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

10 <210> 374
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 374

Phe Ile Arg Tyr Asp Ser Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

20 <210> 375
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 375

Phe Ile Arg Tyr Asp Tyr Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

30 <210> 376
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 376

Phe Ile Arg Tyr Asp Lys Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

40 <210> 377
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 377

Phe Ile Arg Tyr Asp Arg Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

50 <210> 378
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 378

Phe Ile Arg Tyr Asp Asn Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 379

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 379

Phe Ile Arg Tyr Asp Gln Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15

<210> 380

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 380

Phe Ile Arg Tyr Asp Thr Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 381

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 381

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 382

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 382

40

Phe Ile Arg Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

<210> 383

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 383

Phe Ile Arg Tyr Asp Phe Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 384

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 384

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10 Gly

<210> 385

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 385

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 386

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 386

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 387

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 387

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40

<210> 388

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 388

	Phe	Ile	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5				10						15	
	Gly															
	<210> 389															
	<211> 17															
5	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 389															
	Phe	Ile	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5				10						15	
	Gly															
10																
	<210> 390															
	<211> 17															
	<212> PRT															
15	<213> Homo sapiens															
	<400> 390															
	Phe	Ile	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Met	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5				10						15	
	Gly															
20																
	<210> 391															
	<211> 17															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
25																
	<400> 391															
	Phe	Ile	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5				10						15	
	Gly															
30																
	<210> 392															
	<211> 17															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
35																
	<400> 392															
	Phe	Ile	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5				10						15	
	Gly															
	<210> 393															
40	<211> 17															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 393															
45																
	Phe	Ile	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5				10						15	
	Gly															

<210> 394
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 394

 Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Phe Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 10 <210> 395
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 395

 Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 20 <210> 396
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 396
 25
 Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

 <210> 397
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 397

 Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 35 Gly

 <210> 398
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

 <400> 398

 Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 45
 <210> 399
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50

<400> 399

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

5 <210> 400
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 400

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

15 <210> 401
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 401

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

25 <210> 402
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 402

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Pro Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

30 <210> 403
 <211> 17
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

<400> 403

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

40 <210> 404
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 404

Glu Gly Ser His Asp Asn
 1 5

<210> 405
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 405

Ser Gly Ser His Asp Asn
 1 5

10 <210> 406
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 406

His Gly Ser His Asp Asn
 1 5

20 <210> 407
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 407

Lys Gly Ser His Asp Asn
 1 5

30 <210> 408
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 408

Gln Gly Ser His Asp Asn
 1 5

35 <210> 409
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 409

Thr Gly Ser His Asp Asn
 1 5

45 <210> 410
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 410

Ala Gly Ser His Asp Asn
 1 5

55 <210> 411
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 411

Leu Gly Ser His Asp Asn
1 5

5

<210> 412

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 412

Pro Gly Ser His Asp Asn
1 5

15

<210> 413

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 413

Phe Gly Ser His Asp Asn
1 5

25

<210> 414

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 414

His Asp Ser His Asp Asn
1 5

35

<210> 415

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 415

40

His Cys Ser His Asp Asn
1 5

<210> 416

<211> 6

45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 416

50

His His Ser His Asp Asn
1 5

<210> 417

<211> 6

55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 417

		His Arg Ser His Asp Asn
		1 5
5	<210> 418	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 418	
10		His Thr Ser His Asp Asn
		1 5
	<210> 419	
	<211> 6	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 419	
20		His Gly Ser His Asp Asn
		1 5
	<210> 420	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 420	
30		His Val Ser His Asp Asn
		1 5
	<210> 421	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 421	
40		His Met Ser His Asp Asn
		1 5
	<210> 422	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 422	
50		His Leu Ser His Asp Asn
		1 5
	<210> 423	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 423	
55		His Ile Ser His Asp Asn
		1 5

5 <210> 424
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 424

His Pro Ser His Asp Asn
 1 5

10 <210> 425
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 425

His Trp Ser His Asp Asn
 1 5

20 <210> 426
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 426

His Gly Asp His Asp Asn
 1 5

30 <210> 427
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 427

His Gly Ser His Asp Asn
 1 5

35 <210> 428
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 428

His Gly Tyr His Asp Asn
 1 5

45 <210> 429
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 429

His Gly His His Asp Asn
 1 5

55 <210> 430
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 430		
		His Gly Arg His Asp Asn 1 5
5	<210> 431 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
10	<400> 431	
		His Gly Asn His Asp Asn 1 5
15	<210> 432 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
20	<400> 432	
		His Gly Thr His Asp Asn 1 5
25	<210> 433 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 433	
30		His Gly Gly His Asp Asn 1 5
35	<210> 434 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 434	
40		His Gly Ala His Asp Asn 1 5
45	<210> 435 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 435	
50		His Gly Ile His Asp Asn 1 5
55	<210> 436 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 436	
		His Gly Pro His Asp Asn 1 5

<210> 437
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 437

His Gly Trp His Asp Asn
 1 5

10 <210> 438
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 438

His Gly Phe His Asp Asn
 1 5

20 <210> 439
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 439

His Gly Ser His Asp Asn
 1 5

30 <210> 440
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 440

His Gly Ser Arg Asp Asn
 1 5

<210> 441
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 441

His Gly Ser Thr Asp Asn
 1 5

<210> 442
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 442

His Gly Ser Ala Asp Asn
 1 5

55 <210> 443
 <211> 6

	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 443		
5		His Gly Ser Val Asp Asn	
		1 5	
	<210> 444		
	<211> 6		
10	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 444		
		His Gly Ser Leu Asp Asn	
15		1 5	
	<210> 445		
	<211> 6		
	<212> PRT		
20	<213> Homo sapiens		
	<400> 445		
		His Gly Ser Ile Asp Asn	
25		1 5	
	<210> 446		
	<211> 6		
	<212> PRT		
30	<213> Homo sapiens		
	<400> 446		
		His Gly Ser Phe Asp Asn	
35		1 5	
	<210> 447		
	<211> 6		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 447		
		His Gly Ser His Asp Asn	
		1 5	
45	<210> 448		
	<211> 6		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 448		
		His Gly Ser His Ser Asn	
		1 5	
	<210> 449		
55	<211> 6		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		

	<400> 449	
		His Gly Ser His Tyr Asn 1 5
5	<210> 450 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
10	<400> 450	
		His Gly Ser His His Asn 1 5
15	<210> 451 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
20	<400> 451	
		His Gly Ser His Arg Asn 1 5
25	<210> 452 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
	<400> 452	
30		His Gly Ser His Asn Asn 1 5
	<210> 453 <211> 6 <212> PRT	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 453	
40		His Gly Ser His Gly Asn 1 5
	<210> 454 <211> 6 <212> PRT	
45	<213> Homo sapiens	
	<400> 454	
		His Gly Ser His Ala Asn 1 5
50	<210> 455 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens	
55	<400> 455	

		His Gly Ser His Val Asn 1 5
5	<210> 456 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 456	
10		His Gly Ser His Ile Asn 1 5
15	<210> 457 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 457	
20		His Gly Ser His Asp Ser 1 5
25	<210> 458 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 458	
30		His Gly Ser His Asp His 1 5
35	<210> 459 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 459	
40		His Gly Ser His Asp Lys 1 5
45	<210> 460 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 460	
50		His Gly Ser His Asp Arg 1 5
55	<210> 461 <211> 6 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 461	
		His Gly Ser His Asp Asn 1 5

<210> 462
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 462

His Gly Ser His Asp Thr
 1 5

10 <210> 463
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 463

His Gly Ser His Asp Gly
 1 5

20 <210> 464
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 464

His Gly Ser His Asp Ala
 1 5

30 <210> 465
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 465

His Gly Ser His Asp Leu
 1 5

35 <210> 466
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 466

His Gly Ser His Asp Ile
 1 5

45 <210> 467
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 467

His Gly Ser His Asp Pro
 1 5

55 <210> 468
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 468
 5
 His Gly Ser His Asp Trp
 1 5
 <210> 469
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 469
 His Gly Ser His Asp Phe
 1 5
 15
 <210> 470
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 470
 Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Asp Asn Thr Val Lys
 1 5 10
 25
 <210> 471
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 471
 Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Cys Asn Thr Val Lys
 1 5 10
 35 <210> 472
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 472
 Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Lys
 1 5 10
 <210> 473
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 473
 50
 Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Tyr Asn Thr Val Lys
 1 5 10
 <210> 474
 <211> 13
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 474

		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Lys Asn Thr Val Lys
		1 5 10
	<210> 475	
	<211> 13	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 475	
10		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Arg Asn Thr Val Lys
		1 5 10
	<210> 476	
	<211> 13	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 476	
20		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Asn Asn Thr Val Lys
		1 5 10
	<210> 477	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 477	
30		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Thr Asn Thr Val Lys
		1 5 10
	<210> 478	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 478	
40		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Pro Asn Thr Val Lys
		1 5 10
	<210> 479	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 479	
45		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asp Thr Val Lys
		1 5 10
	>210> 480	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 480	
		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Glu Thr Val Lys
		1 5 10

<210> 481
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 481

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Ser Thr Val Lys
 1 . 5 10

10 <210> 482
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 482

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Thr Val Lys
 1 5 10

20 <210> 483
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 483

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser His Thr Val Lys
 1 5 10

30 <210> 484
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 484

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Lys Thr Val Lys
 1 5 10

35 <210> 485
 <211> 13
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 485

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Lys
 1 5 10

45 <210> 486
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 486

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Gln Thr Val Lys
 1 5 10

55 <210> 487
 <211> 13

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 487

5

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Thr Thr Val Lys
 1 5 10

<210> 488
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 488

10

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Gly Thr Val Lys
 1 5 10

15

<210> 489
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 489

20

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Met Thr Val Lys
 1 5 10

25

<210> 490
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 490

30

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Ile Thr Val Lys
 1 5 10

35

<210> 491
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 491

40

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asp Val Lys
 1 5 10

45

<210> 492
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 492

50

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Cys Val Lys
 1 5 10

55

<210> 493
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 493

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Lys
1 5 10

5 <210> 494
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 494

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Lys
1 5 10

15 <210> 495
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 495

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn His Val Lys
1 5 10

25 <210> 496
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 496

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Lys Val Lys
1 5 10

30 <210> 497
<211> 13
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 497

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Arg Val Lys
1 5 10

40 <210> 498
<211> 13
<212> PRT
45 <213> Homo sapiens

<400> 498

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asn Val Lys
1 5 10

50 <210> 499
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 499

		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Gln Val Lys
		1 5 10
	<210> 500	
	<211> 13	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 500	
		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Lys
		1 5 10
10	<210> 501	
	<211> 13	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 501	
		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ala Val Lys
		1 5 10
20	<210> 502	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 502	
		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Val Val Lys
		1 5 10
30	<210> 503	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 503	
		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Leu Val Lys
		1 5 10
	<210> 504	
40	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 504	
45		Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ile Val Lys
		1 5 10
	<210> 505	
	<211> 13	
50	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 505	

		Ser	Gly	Gly	Arg	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Pro	Val	Lys
		1				5					10			
		<210> 506												
		<211> 7												
5		<212> PRT												
		<213> Homo sapiens												
		<400> 506												
		Asp	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser						
		1				5								
10														
		<210> 507												
		<211> 7												
		<212> PRT												
15		<213> Homo sapiens												
		<400> 507												
		Glu	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser						
		1				5								
20														
		<210> 508												
		<211> 7												
		<212> PRT												
		<213> Homo sapiens												
25														
		<400> 508												
		Cys	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser						
		1				5								
30														
		<210> 509												
		<211> 7												
		<212> PRT												
		<213> Homo sapiens												
35														
		<400> 509												
		Ser	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser						
		1				5								
40														
		<210> 510												
		<211> 7												
		<212> PRT												
		<213> Homo sapiens												
		<400> 510												
45														
		Tyr	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser						
		1				5								
		<210> 511												
		<211> 7												
50		<212> PRT												
		<213> Homo sapiens												
		<400> 511												
		His	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser						
		1				5								
55														

5 <210> 512
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 512

Lys Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

10 <210> 513
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 513

Arg Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

20 <210> 514
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 514

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

30 <210> 515
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 515

Gln Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

35 <210> 516
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 516

Thr Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

45 <210> 517
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 517

Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser
 1 5

55 <210> 518
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 518

Ala Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

5

<210> 519

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 519

Val Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

15

<210> 520

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 520

Met Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

25

<210> 521

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 521

Leu Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

35

<210> 522

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 522

40

Ile Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 523

<211> 7

45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 523

Pro Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

50

<210> 524

<211> 7

<212> PRT

55

<213> Homo sapiens

<400> 524

		Trp Asn Asp Gln Arg Pro Ser
		1 5
	<210> 525	
	<211> 7	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 525	
		Phe Asn Asp Gln Arg Pro Ser
		1 5
10	<210> 526	
	<211> 7	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 526	
		Gly Asn Asp Ser Arg Pro Ser
		1 5
20	<210> 527	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 527	
		Gly Asn Asp Tyr Arg Pro Ser
		1 5
30	<210> 528	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 528	
		Gly Asn Asp Arg Arg Pro Ser
		1 5
	<210> 529	
40	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 529	
45		Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser
		1 5
	<210> 530	
	<211> 7	
50	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 530	
		Gly Asn Asp Thr Arg Pro Ser
		1 5
55	<210> 531	

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 531

 Gly Asn Asp Ala Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 532
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 532

 Gly Asn Asp Ile Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 533
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 533
 25

 Gly Asn Asp Pro Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 534
 30 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 534

 Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10
 35

 <210> 535
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

 <400> 535

 Gln Ser Tyr Cys Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10
 45

 <210> 536
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50

 <400> 536

 Gln Ser Tyr Ser Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10
 55

 <210> 537
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 537

Gln Ser Tyr Tyr Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

5 <210> 538
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 538

Gln Ser Tyr Asn Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

15 <210> 539
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 539

Gln Ser Tyr Gln Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

25 <210> 540
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 540

Gln Ser Tyr Thr Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

30 <210> 541
<211> 12
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 541

Gln Ser Tyr Gly Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

40 <210> 542
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 542

Gln Ser Tyr Ala Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

50 <210> 543
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 543

	Gln Ser Tyr Leu Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 544
	<211> 12
5	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 544
	Gln Ser Tyr Ile Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
10	<210> 545
	<211> 12
	<212> PRT
15	<213> Homo sapiens
	<400> 545
	Gln Ser Tyr Trp Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
20	<210> 546
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
25	<400> 546
	Gln Ser Tyr Phe Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
30	<210> 547
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
35	<400> 547
	Gln Ser Tyr Asp Asp Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 548
40	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 548
45	
	Gln Ser Tyr Asp Cys Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 549
	<211> 12
50	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 549
	Gln Ser Tyr Asp Ser Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
55	

<210> 550
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 550

Gln Ser Tyr Asp Tyr Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

10 <210> 551
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 551

Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

20 <210> 552
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 552

Gln Ser Tyr Asp Asn Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

30 <210> 553
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 553

Gln Ser Tyr Asp Gln Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

35 <210> 554
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 554

Gln Ser Tyr Asp Thr Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

45 <210> 555
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 555

Gln Ser Tyr Asp Gly Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

55 <210> 556
 <211> 12

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 556

5

Gln Ser Tyr Asp Ala Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

<210> 557
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 557

Gln Ser Tyr Asp Val Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

15

<210> 558
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 558

Gln Ser Tyr Asp Met Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

25

<210> 559
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 559

Gln Ser Tyr Asp Leu Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

35

<210> 560
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<400> 560

Gln Ser Tyr Asp Ile Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

45

<210> 561
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 561

50

Gln Ser Tyr Asp Pro Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

55

<210> 562
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 562

```

Gln Ser Tyr Asp Trp Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
 1             5             10

```

5 <210> 563
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 563

```

Gln Ser Tyr Asp Arg Asp Thr His Pro Ala Leu Leu
 1             5             10

```

15 <210> 564
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 564

```

Gln Ser Tyr Asp Arg Cys Thr His Pro Ala Leu Leu
 1             5             10

```

25 <210> 565
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 565

```

Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Thr His Pro Ala Leu Leu
 1             5             10

```

30 <210> 566
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 566

```

Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr His Pro Ala Leu Leu
 1             5             10

```

40 <210> 567
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 567

```

Gln Ser Tyr Asp Arg His Thr His Pro Ala Leu Leu
 1             5             10

```

50 <210> 568
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 568

	Gln Ser Tyr Asp Arg Arg Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 569
	<211> 12
5	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 569
10	Gln Ser Tyr Asp Arg Asn Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 570
	<211> 12
	<212> PRT
15	<213> Homo sapiens
	<400> 570
20	Gln Ser Tyr Asp Arg Gln Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 571
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
25	<400> 571
30	Gln Ser Tyr Asp Arg Thr Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 572
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
35	<400> 572
40	Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 573
	<211> 12
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 573
45	Gln Ser Tyr Asp Arg Ala Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10
	<210> 574
	<211> 12
50	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 574
55	Gln Ser Tyr Asp Arg Val Thr His Pro Ala Leu Leu
	1 5 10

<210> 575
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 575

Gln Ser Tyr Asp Arg Leu Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

10 <210> 576
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 576

Gln Ser Tyr Asp Arg Ile Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

20 <210> 577
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 577

Gln Ser Tyr Asp Arg Pro Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

30 <210> 578
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 578

Gln Ser Tyr Asp Arg Trp Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

35 <210> 579
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 579

Gln Ser Tyr Asp Arg Phe Thr His Pro Ala Leu Leu
 1 5 10

45 <210> 580
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> construcción sintética

50 <223> los nucleótidos de las posiciones 16 a 34 pueden sustituirse con cualquier nucleótido de modo que los nucleótidos aleatorios representen el 12% de la secuencia

<400> 580
 55 tgtcccttg cccagtagt catagctccc actggtcgta cagtaata 48

<210> 581
 <211> 35

<212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 581
 5 gacacctga tcagcggata acaatttcac acagg 35

<210> 582
 <211> 15
 <212> ADN
 10 <213> construcción sintética

<400> 582
 tggggccaag ggaca 15

15 <210> 583
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> construcción sintética

20 <400> 583
 attcgtccta taccgttcta cttgtcgtc ttccagacg ttagt 45

<210> 584
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 584
 attcgtccta taccgttc 18

30 <210> 585
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> construcción sintética

35 <223> los nucleótidos de las posiciones 28 a 42 pueden sustituirse con cualquier nucleótido de modo que los nucleótidos aleatorios representen el 12% de la secuencia

<400> 585

40 ggtcccagtt ccgaagaccc tcgaacccct caggtcgtg tcatacgact ggcagtaata 60
 gtcagc 66

<210> 586
 <211> 15
 <212> ADN
 45 <213> construcción sintética

<400> 586
 tggggccaag ggaca 15

50 <210> 587
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> construcción sintética

55 <400> 587
 tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

<210> 588
 <211> 16
 60 <212> ADN
 <213> construcción sintética

<400> 588
 gacacctga tcagcg 16

- <210> 589
 <211> 48
 <212> ADN
 5 <213> construcción sintética
- <400> 589
 gagtcattct cgacttgcgg ccgcacctag gacggtcagc ttggtccc 48
- 10 <210> 590
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 15 <400> 590
- Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Phe Thr Gly Ser Met Val
 1 5 10
- 20 <210> 591
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 25 <220>
 <223> Xaa se codifica por un codón aleatorio de secuencia NNS siendo N cualquier nucleótido y siendo S desoxicitosina o desoxiguanidina
- <400> 591
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Thr Gly Ser Met Val
 1 5 10
- 30 <210> 592
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 35 <220>
 <223> Xaa se codifica por un codón aleatorio de secuencia NNS siendo N cualquier nucleótido y siendo S desoxicitosina o desoxiguanidina
- 40 <400> 592
- Gln Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Met Val
 1 5 10
- 45 <210> 593
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 50 <220>
 <223> Xaa se codifica por un codón aleatorio de secuencia NNS siendo N cualquier nucleótido y siendo S desoxicitosina o desoxiguanidina
- <400> 593
- Gln Ser Tyr Asp Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
- 55 <210> 594
 <211> 100
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

<400> 594

```

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

```

5

<210> 595

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 595

```

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

```

15

<210> 596

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 596

```

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

```

<210> 597
 <211> 100
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 597

```

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

```

10
 <210> 598
 <211> 98
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 598

```

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

Ala Lys

```

<210> 599

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 599

```

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

Ala Arg

```

10

<210> 600

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 600

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

<210> 601
 <211> 98
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 601

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

10
 <210> 602
 <211> 98
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 602

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

<210> 603
 <211> 100
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 603

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

10
 <210> 604
 <211> 100
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 604

```

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

                        85                        90                        95

Tyr Cys Thr Thr
          100

```

<210> 605
 <211> 100
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 605

```

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

Tyr Cys Thr Thr
          100

```

10

 <210> 606
 <211> 100
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 606

```

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

```

<210> 607
 <211> 100
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 607

```

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

```

10
 <210> 608
 <211> 100
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 608

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

<210> 609
 <211> 100
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 609

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

<210> 610
 <211> 98
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 610

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

<210> 611

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 611

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

10

<210> 612

<211> 98

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 612

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

<210> 613

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 613

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

10

<210> 614

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 614

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

<210> 615

<211> 97

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 615

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

Arg

10

<210> 616

<211> 97

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 616

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg

<210> 617
 <211> 97
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 617

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

10 <210> 618
 <211> 97
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 618

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

20 <210> 619
 <211> 98
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 619

```

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

```

5 Ala Lys

<210> 620

<211> 98

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 620

```

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

```

15 Val Lys

<210> 621

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 621

```

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

```

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

<210> 622

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 622

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

10

<210> 623

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 623

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys

<210> 624

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 624

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

10

<210> 625

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 625

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

20

<210> 626

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 626

```

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

```

5 <210> 627
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 627

```

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

```

15 <210> 628
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 628

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

```

```

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

Ala Arg

```

<210> 629
 <211> 98
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 629

```

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

Ala Arg

```

10
 <210> 630
 <211> 98
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 630

```

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

```

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

Ala Arg

$\langle 210 \rangle$ 631

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 631

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

$\langle 210 \rangle$ 632

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 632

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 633

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 633

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

<210> 634

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 634

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

10

<210> 635

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 635

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

<210> 636
<211> 98
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 636

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

<210> 637
<211> 98
10 <212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<400> 637

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

85

90

95

Ala Lys

<210> 638

<211> 97

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 638

```

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

```

10

Arg

<210> 639

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 639

```

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

```

Ala Arg

20

<210> 640

<211> 98

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 640

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

<210> 641
 <211> 98
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 641

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

10
 <210> 642
 <211> 98
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 642

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg

<210> 643
<211> 98
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 643

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

10
<210> 644
<211> 98
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<400> 644

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

20
<210> 645
<211> 98
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 645

```

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

```

5 <210> 646
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 646

```

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

```

15 <210> 647
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 647

```

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

Ala Arg

```

<210> 648

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 648

```

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

Ala Arg

```

10

<210> 649

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 649

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1             5             10             15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
             20             25             30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
             35             40             45
Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```

```

          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys

```

<210> 650
 <211> 98
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 650

```

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

```

<210> 651
 <211> 98
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 651

```

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

```

<210> 652
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 652

```

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

```

5 <210> 653
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 653

```

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

```

15 <210> 654
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 654

20

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1             5             10             15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20             25             30

```

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

<210> 655

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 655

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

10

<210> 656

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 656

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

20

<210> 657
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 657

```

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

```

10 <210> 658
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 658

```

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

```

20 <210> 659
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 659

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

<210> 660
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 660

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

<210> 661
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 661

Glu Asp Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Leu His Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val

```

          35          40          45
Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
   50          55          60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr Leu
   65          70          75          80
Gln Met Asn Ser Leu Ile Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95
Arg

```

<210> 662
 <211> 98
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 662

```

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

```

10 Ala Arg

<210> 663
 <211> 98
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 663

```

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

```

20

Ala Arg

<210> 664
 211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 664

```

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

Ala Arg

```

10 <210> 665
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 665

```

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

Thr Arg

```

20 <210> 666
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 666

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

<210> 667
 <211> 98
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 667

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

10
 <210> 668
 211> 98
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 668

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ala

<210> 669

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 669

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

10

<210> 670

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 670

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

20

<210> 671

<211> 98

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 671

5

```

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

Ser Gly

```

<210> 672
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 672

10

```

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

Asn Gly

```

15

<210> 673
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 673

```

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

```

```

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

Leu Asn Ala

```

<210> 674

<211> 99

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 674

```

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

Leu Ser Gly

```

10

<210> 675

<211> 98

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 675

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
      1             5             10             15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn
      20             25             30
Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
      35             40             45
Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
      50             55             60

```

Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Val	Gln
65					70					75					80
Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	Leu
				85					90					95	
Arg Gly															

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une a IL-12 humana y se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad k_{off} de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, como se determina por resonancia de plasmón superficial, en el que dicho anticuerpo inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de proliferación de blastos por fitohemaglutinina *in vitro* (ensayo de PHA) con una CI_{50} de $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menos.
2. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 1, o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1.
3. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 1, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad k_{off} de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos e inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o menos.
4. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 1, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se disocia de IL-12 humana con una constante de velocidad k_{off} de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos e inhibe la proliferación de blastos por fitohemaglutinina en un ensayo de PHA *in vitro* con una CI_{50} de $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ o menos.
5. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 1, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene las siguientes características:
 - a) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; y
 - b) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 10.
6. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 5, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene además una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11; y tiene una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12.
7. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 5, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene además una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 13; y tiene una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14.
8. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 5, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 15; y tiene una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16.
9. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 1, o una parte de unión a antígeno del mismo, que
 - a) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 404-SEC ID N°: 469; o
 - b) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 534-SEC ID N°: 579.
10. El anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 9 que tiene además una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 335-SEC ID N°: 403; o una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 506-SEC ID N°: 533.
11. El anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 9 que tiene además una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 288-SEC ID N°: 334; o una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 470-SEC ID N°: 505.
12. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 1, o una parte de unión a antígeno del mismo, que
 - a) tiene una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25; y
 - b) tiene una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26.
13. El anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 12 que tiene además una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27; y una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28.
14. El anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 12 que tiene además una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29; y una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30.

15. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 1, o una parte de unión a antígeno del mismo, que tiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32.
- 5 16. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 15, que comprende una región constante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las regiones constantes de IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE.
17. El anticuerpo humano aislado de la reivindicación 16, en el que la región constante de cadena pesada del anticuerpo es IgG1.
- 10 18. La parte de anticuerpo humano aislado de la reivindicación 15, que es un fragmento Fab.
19. La parte de anticuerpo humano aislado de la reivindicación 15, que es un fragmento F(ab')₂.
- 15 20. La parte de anticuerpo humano aislado de la reivindicación 15, que es un fragmento Fv de cadena sencilla.
21. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, que comprende además un agente adicional.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en la que el agente adicional es un agente terapéutico.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 23, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos monoclonales anti-IL-1 β , anticuerpos monoclonales anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de pirimidil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil micofenolato, leflunomida, AINE, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, inhibidores de MAP quinasa, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de enzima convertidora de TNF α , inhibidores de señalización de linfocitos T, inhibidores de metaloproteína, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocina soluble, receptor de TNF p55 soluble, receptor de TNF p75 soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citocinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 y TGF β .
- 30 25. La composición farmacéutica de la reivindicación 23, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-TNF y fragmentos de anticuerpos de los mismos, construcciones TNFR-Ig, inhibidores de TACE, inhibidores de PDE4, corticosteroides, budenosida, dexametasona, sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, olsalazina, inhibidores de enzima convertidora de IL-1 β , IL-1ra, inhibidores de tirosina quinasa, 6-mercaptopurinas e IL-11.
- 40 26. La composición farmacéutica de la reivindicación 23, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides, prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón β 1, interferón β 1b, Copolímero 1, oxígeno hiperbárico, inmunoglobulina intravenosa, clabribina, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, PDGF, anticuerpos para CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil micofenolato, leflunomida, AINE, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, inhibidores de MAP quinasa, IRAK, NIK, IKK o p38, inhibidores de enzima convertidora de IL-1 β , inhibidores de TACE, inhibidores de señalización de linfocitos T, inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteína, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocina soluble, receptor de TNF p55 soluble, receptor de TNF p75 soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, sIL-13R, anti-P75, ligando de glicoproteína p-selectina (PSGL), citocinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-13 y TGF β .
- 55 27. Un método para inhibir la actividad de IL-12 humana *in vitro* que comprende poner en contacto IL-12 humana con el anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20 de modo que se inhiba la actividad de IL-12 humana.
- 60 28. Uso del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, para fabricar un medicamento para tratar o prevenir un trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva,
- 65

- espondiloartropatía, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis esclerodermia, tiroiditis, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órganos, enfermedad inmunológica o crónica asociada con trasplante de órganos, sarcoidosis, aterosclerosis, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Grave, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, púrpura de Henoch Schonlein, vasculitis microscópica de los riñones, hepatitis activa crónica, síndrome de Sjögren, uveítis, sepsis, choque séptico, síndrome de sepsis, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, coagulopatía, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, miastenia grave, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, cirrosis biliar primaria, enfermedades fibróticas pulmonares, anemia hemolítica, tumores malignos, insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio por administración al sujeto humano.
29. El uso de la reivindicación 28, en el que el trastorno es psoriasis.
30. El uso de la reivindicación 28, en el que el trastorno es enfermedad de Crohn.
31. El uso de la reivindicación 28, en el que el trastorno es esclerosis múltiple.
32. El uso de la reivindicación 28, en el que el trastorno es artritis reumatoide.
33. Un método para detectar IL-12 humana que comprende poner en contacto IL-12 humana *in vitro* con el anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20 de modo que se detecte IL-12 humana.
34. El método de la reivindicación 33, en el que IL-12 humana se detecta en una muestra biológica para fines de diagnóstico.
35. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo humano, o parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 25.
36. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 35, en la que el anticuerpo humano o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27.
37. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 36, en la que el anticuerpo humano, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 29.
38. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 37, que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31.
39. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo humano, o parte de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 26.
40. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 39, en la que el anticuerpo humano o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 28.
41. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 40, en la que el anticuerpo humano, o parte de unión a antígeno del mismo, comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 30.
42. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 41, que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32.
43. Un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 35-42.
44. Una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector de expresión recombinante de la reivindicación 43.
45. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 43 que codifica:

- a) una cadena pesada de anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 31; y
- b) una cadena ligera de anticuerpo que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 32.

- 5
46. La célula hospedadora de la reivindicación 43 en la que se ha introducido el vector de expresión recombinante de la reivindicación 44.
- 10
47. Un método para sintetizar un anticuerpo humano, o una parte de un ionógeno del mismo, de la reivindicación 1, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 44 o 46 en un medio de cultivo hasta que se sintetice el anticuerpo humano, o parte de un ionógeno del mismo por la célula.

Figura 1A. Secuencias de región variable de cadena pesada

SEC ID	No.	Número de kabat
33	JOE9wt VH	
35	Cos-3/JH3 VH	
37	70-1 VH	
39	78-34 VH	
41	79-1 VH	
43	101-11 VH	
45	26-1 VH	
47	136-15 VH	
49	136-15 vs I. germinal	
51	149-5 VH	
53	149-6 VH	
55	103-4 VH	
57	103-8 VH	
59	103-14 VH	
61	G6 VH	
63	Y139 VH	
65	A03 VH	
67	A03 VH I. germinal	
23	Y61 VH	
69	Y61' VH I. germinal	
71	Y61-H31E VH	
73	Y61 L50Y VH	
75	Y61-L94Y VH	
31	J695	

Figura 1B Secuencias de región variable de cadena pesada

SEC ID Nº:	Número de kabat	CDR H2	CDR H3	
33	JOE9wt VH	57 58 59 60 61 62 63 64 65	95 96 97 98 99 100 101 102	113 112 111 110 109 108 107 106 105 104 103
35	Cos-3/Jh3 VH	KYADSVKG	SGSYDY	WGQGTMTVSS
37	70-1 VH	N.....AK	H..H.N	
39	78-34 VH			
41	79-1 VH			
43	101-11 VH			
45	26-1 VH		H..H.N	
47	136-15 VH		H..H.N	
49	136-15 vh i. germinal		H..H.N	
51	149-5 VH	N.....	H..H.N	
53	149-6 VH		H..H.T	
55	103-4 VH		H..H.N	
57	103-8 VH		H..H.N	
59	103-14 VH		H..H.N	
61	G6 VH		H..H.N	
63	Y139 VH		H..H.N	
65	AO3 VH		H..H.N	
67	AO3 VH i. germinal		H..H.N	
23	Y61 VH	N.....	H..H.N	
69	Y61 VH i. germinal		H..H.N	
71	Y61-H31E VH	N.....	H..H.N	
73	Y61 L50Y VH		H..H.N	
75	Y61-L94Y VH		H..H.N	
31	J695	N.....	H..H.N	

Figura 1C Secuencias de región variable de cadena ligera

SEC ID	Número de kabat	CDR L1	CDR L2
Nº:	Joe9 VL wt		
34	Dpl8 Lvl042/JAL		
36	70-1 VL		
38	78-34 VL		
40	79-1 VL		
42	101-11 VL		
44	26-1 VL		
46	136-15 VL		
48	136-15 VL i. germinal		
50	149-5 VL		
52	149-6 VL		
54	103-4 VL		
56	103-8 VL		
58	103-14 VL		
60	G6 VL		
62	Y139 VL		
64	AO3 VL		
66	AO3 VL i. germinal		
68	Y61 VL		
70	Y61 VL i. germinal		
72	Y61-H31E VL		
74	Y61-L50Y VL		
76	Y61-L94Y VL		
32	J695 VL		

Figura 1D Secuencias de región variable de cadena ligera

SEC ID Nº:	Número de Kabat	CDR L3
34	Joe9 VL wt	GVPDRFSGSKSGTSASLAITGVQAEDEADYYC QSYDSSLRGSRV FGTGTKVTVLG
36	Dp18 Lv1042/JA1	L.....S.....
38	70-1 VL	
40	78-34 VL	RGFT.....
42	79-1 VL	W.....
44	101-11 VL	RGFT.....
46	26-1 VL	W.....
48	136-15 VL	T...KGFT...S.....
50	136-15 VL i. germinal	T...KGFT...S.....
52	149-5 VL	W...T.....
54	149-6 VL	RGFT.....
56	103-4 VL	RGFT.A.....
58	103-8 VL	T...KGFT...S.....
60	103-14 VL	ERGFT...M.....
62	G6 VL	RGTHPLTI.....
64	Y139 VL	RGSHPALT.....
66	AO3 VL	RGTHPLTM.....
68	AO3 VL i. germinal	RGTHPLTM.....
24	Y61 VL	RGTHPAIL.....
70	Y61 VL i. germinal	RGTHPAIL.....
72	Y61-H31E VL	RGTHPAIL.....
74	Y61-I50Y VL	RGTHPAIL.....
76	Y61-I94Y VL	RYTHPAIL.....
32	J695 VL	RYTHPAIL.....

FIG. 2A

Mutagénesis de CDR H1 de cadena pesada de Y61

SEC ID Nº:		CDR H1									k_{off} ($\times 10^5$)
		27	28	29	30	31	32	33	34	35	
21	Y61	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	
288		.	.	.	E	.	.	.	.	.	22,8
289		.	.	.	S	.	.	.	.	.	16,8
290		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	31,9
291		.	.	.	H	.	.	.	.	.	29,6
292		.	.	.	K	.	.	.	.	.	22,5
293		.	.	.	R	.	.	.	.	.	24,5
294		.	.	.	N	.	.	.	.	.	30,1
295		.	.	.	T	.	.	.	.	.	32,0
296		.	.	.	G	.	.	.	.	.	23,3
297		.	.	.	V	.	.	.	.	.	39,9
298		.	.	.	I	.	.	.	.	.	20,7
299		.	.	.	W	.	.	.	.	.	21,6
300		.	.	.	E	.	.	.	.	.	21,9
301		.	.	.	C	.	.	.	.	.	12,0
302		.	.	.	S	.	.	.	.	.	24,9
303		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	39,8
304		.	.	.	H	.	.	.	.	.	30,9
305		.	.	.	R	.	.	.	.	.	66,4
306		.	.	.	N	.	.	.	.	.	19,1
307		.	.	.	Q	.	.	.	.	.	15,2
308		.	.	.	T	.	.	.	.	.	71,6
309		.	.	.	A	.	.	.	.	.	20,5
310		.	.	.	I	.	.	.	.	.	33,4
311		.	.	.	E	.	.	.	.	.	229,0
312		.	.	.	C	.	.	.	.	.	383,0
313		.	.	.	S	.	.	.	.	.	157,5
314		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	33,7
315		.	.	.	H	.	.	.	.	.	46,1
316		.	.	.	R	.	.	.	.	.	448,5
317		.	.	.	N	.	.	.	.	.	297,0
318		.	.	.	T	.	.	.	.	.	148,0
319		.	.	.	A	.	.	.	.	.	165,5
320		.	.	.	V	.	.	.	.	.	133,5
321		.	.	.	L	.	.	.	.	.	226,0
322		.	.	.	I	.	.	.	.	.	160,5
323		.	.	.	D	.	.	.	.	.	152,0
324		.	.	.	E	.	.	.	.	.	189,0
325		.	.	.	C	.	.	.	.	.	286,5
326		.	.	.	S	.	.	.	.	.	39,9
327		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	250,5
328		.	.	.	N	.	.	.	.	.	30,8
329		.	.	.	G	.	.	.	.	.	17,8
330		.	.	.	A	.	.	.	.	.	27,3
331		.	.	.	V	.	.	.	.	.	191,0
332		.	.	.	M	.	.	.	.	.	21,5
333		.	.	.	I	.	.	.	.	.	250,0
334		.	.	.	P	.	.	.	.	.	159,5

FIG. 2A-1

Mutagénesis de Y61: H30

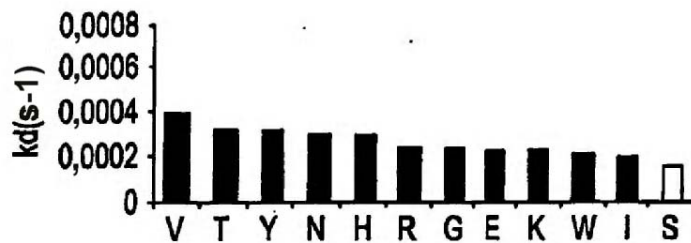


FIG. 2A-2

Mutagénesis de Y61: H31

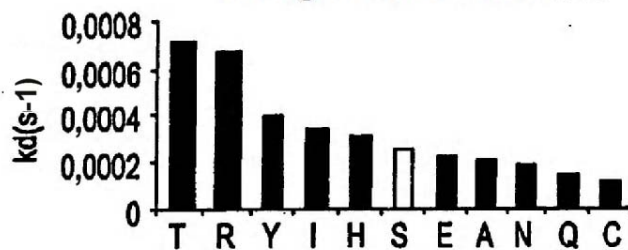


FIG. 2A-3

Mutagénesis de Y61: H32

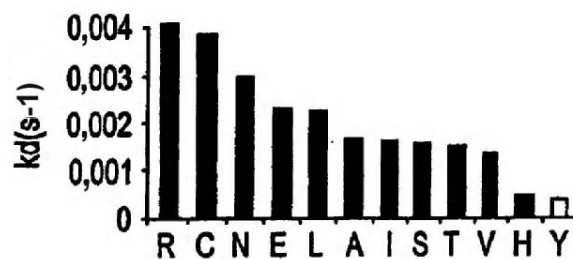


FIG. 2A-4

Mutagénesis de Y61: H33



FIG. 2B

Mutagénesis de CDR H2 de cadena pesada de Y61

SEC ID N°:		CDR H2															k _{off} (x 10 ⁵)		
		50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63		64	65
19	Y61	F	I	R	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
335		E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	34.7
336		C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28.5
337		Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	23.0
338		H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	30.9
339		K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	61.2
340		N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	34.4
341		Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	42.0
342		T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	20.5
343		L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	44.0
344		F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	20.4
345		.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	31.8
346		.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	29.2
347		.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	29.8
348		.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	40.7
349		.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	26.2
350		.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	20.6
351		.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28.5
352		.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	37.4
353		.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	32.1
354		.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	17.1
355		.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	31.7
356		.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	34.7
357		.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	35.1
358		.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	15.1
359		.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	39.9
360		.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	36.8
361		.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	61.1
362		.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	158.0
363		.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	166.5
364		.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	72.7
365		.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	79.2
366		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	50.0
367		.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	40.4
368		.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	44.0
369		.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	109.5
370		.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	94.4
371		.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	168.5
372		.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	45.5
373		.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	35.1
374		.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	37.3
375		.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	64.6
376		.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	40.7
377		.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2.5
378		.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	44.7
379		.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	31.6
380		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	64.4
381		.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	17.8
382		.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	43.5

FIG. 2B-1

Mutagénesis de Y61: H50

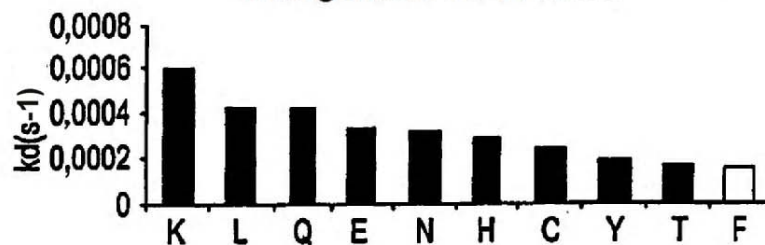


FIG. 2B-2

Mutagénesis de Y61: H52



FIG. 2B-3

Mutagénesis de Y61: H53



FIG. 2B-4

Mutagénesis de Y61: H54

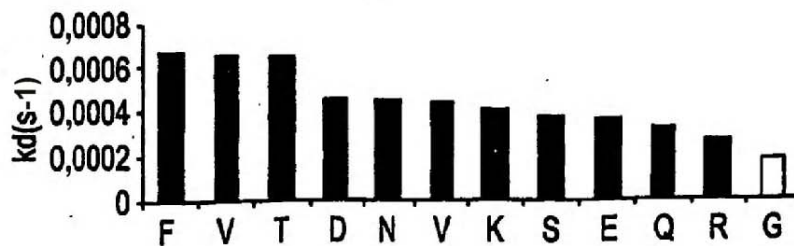


FIG. 2C

Mutagénesis de CDR H2 de cadena pesada de Y61

SEC ID Nº:		CDR H2															k _{off} (x 10 ⁵)		
		50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63		64	65
19	Y61	F	I	R	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
383		.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	66,3
384		.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	62,4
385		.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	39,0
386		.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	42,0
387		.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	38,5
388		.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	23,5
389		.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27,2
390		.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	38,3
391		.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	26,4
392		.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	16,9
393		.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	29,9
394		.	.	.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	34,5
395		.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	41,5
396		.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	94,1
397		.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	31,0
398		.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	83,1
399		.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	52,4
400		.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	73,0
401		.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	65,7
402		.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	62,8
403		.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	79,4

FIG. 2C-1
Mutag nesis de Y61: H56

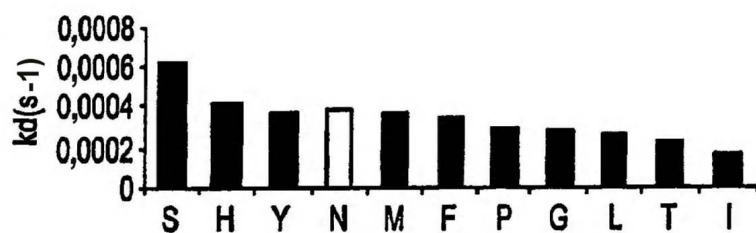


FIG. 2C-2
Mutagénesis de Y61: H58

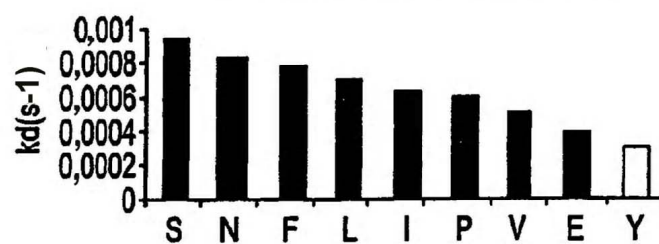


FIG. 2D

Mutagénesis de CDR H3 de cadena pesada de Y61

SEC ID Nº:		CDR H3						k _{off} (x 10 ⁵)
		88	89	97	98	101	102	
17	Y61	H	G	S	H	D	N	
404		E	.	.	.	.	.	231,5
405		S	.	.	.	.	.	193,0
406		H	.	.	.	.	.	28,7
407		K	.	.	.	.	.	227,5
408		Q	.	.	.	.	.	85,9
409		T	.	.	.	.	.	202,0
410		A	.	.	.	.	.	150,0
411		L	.	.	.	.	.	147,5
412		P	.	.	.	.	.	471,0
413		F	.	.	.	.	.	514,0
414		.	D	.	.	.	.	223,5
415		.	C	.	.	.	.	24,2
416		.	H	.	.	.	.	23,7
417		.	R	.	.	.	.	96,2
418		.	T	.	.	.	.	186,0
419		.	G	.	.	.	.	39,7
420		.	V	.	.	.	.	38,2
421		.	M	.	.	.	.	204,5
422		.	L	.	.	.	.	261,0
423		.	I	.	.	.	.	207,5
424		.	P	.	.	.	.	129,0
425		.	W	.	.	.	.	197,0
426		.	.	D	.	.	.	202,0
427		.	.	S	.	.	.	37,5
428		.	.	Y	.	.	.	273,0
429		.	.	H	.	.	.	190,5
430		.	.	R	.	.	.	224,0
431		.	.	N	.	.	.	221,5
432		.	.	T	.	.	.	58,8
433		.	.	G	.	.	.	229,0
434		.	.	A	.	.	.	143,0
435		.	.	I	.	.	.	208,0
436		.	.	P	.	.	.	300,0
437		.	.	W	.	.	.	239,0
438		.	.	F	.	.	.	180,5
439		.	.	.	H	.	.	25,5
440		.	.	.	R	.	.	34,0
441		.	.	.	T	.	.	22,7
442		.	.	.	A	.	.	67,3
443		.	.	.	V	.	.	29,3
444		.	.	.	L	.	.	59,8
445		.	.	.	I	.	.	34,3
446		.	.	.	F	.	.	68,8
447		.	.	.	.	D	.	14,4
448		.	.	.	.	S	.	44,9
449		.	.	.	.	Y	.	465,0
450		.	.	.	.	H	.	327,0
451		.	.	.	.	R	.	110,0

FIG. 2D-1

Mutagénesis de Y61: H95



FIG. 2D-2

Mutagénesis de Y61: H96

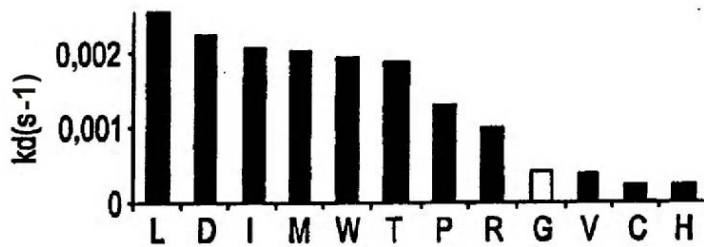


FIG. 2D-3

Mutagénesis de Y61: H97



FIG. 2D-4

Mutagénesis de Y61: H98

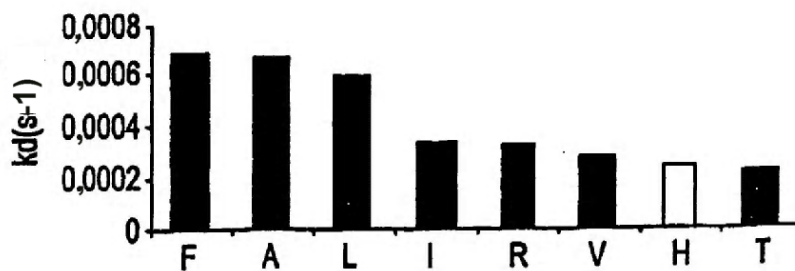


FIG. 2E

Mutagénesis de CDR H3 de cadena pesada de Y61

SEC ID Nº:		CDR H3						K_{off} ($\times 10^5$)
		95	96	97	98	101	102	
17	Y61	H	G	S	H	D	N	
452			.	.	.	N	.	223,0
453			.	.	.	G	.	375,0
454			.	.	.	A	.	106,5
455			.	.	.	V	.	163,0
456			.	.	.	I	.	162,5
457			.	.	.	.	S	32,5
458			.	.	.	.	H	18,0
459			.	.	.	.	K	40,5
460			.	.	.	.	R	57,5
461			.	.	.	.	N	40,3
462			.	.	.	.	T	33,3
463			.	.	.	.	G	69,2
464			.	.	.	.	A	38,2
465			.	.	.	.	L	95,6
466			.	.	.	.	I	99,6
467			.	.	.	.	P	181,5
468			.	.	.	.	W	23,5
469			.	.	.	.	F	31,8

FIG. 2E-1

Mutagénesis de Y61: H101



FIG. 2E-2

Mutagénesis de Y61: H102



FIG. 2F

Mutagénesis de CDR L1 de cadena ligera de Y61

SEC ID Nº:		CDR L1													$-k_{off}$ ($\times 10^5$)
		24	25	26	27	27A	27B	28	29	30	31	32	33	34	
22	Y61	S	G	G	R	S	N	I	G	S	N	T	V	K	
470		.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	22,0
471		.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	18,6
472		.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	21,1
473		.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	48,3
474		.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	34,6
475		.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	18,2
476		.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	16,6
477		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	22,6
478		.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	25,0
479		.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	58,0
480		.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	38,4
481		.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	39,2
482		.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	35,7
483		.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	31,5
484		.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	33,1
485		.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	22,9
486		.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	29,2
487		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	30,9
488		.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	36,6
489		.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	17,4
490		.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	9,7
491		.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	25,2
492		.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	381,5
493		.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	191,0
494		.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	21,3
495		.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	26,0
496		.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	31,8
497		.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	690,0
498		.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	196,5
499		.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	247,0
500		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	24,1
501		.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	190,5
502		.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	164,5
503		.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	215,5
504		.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	154,0
505		.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	42,4

FIG. 2F-1

Mutagénesis de Y61: L30

**FIG. 2F-2**

Mutagénesis de Y61: L31

**FIG. 2F-3**

Mutagénesis de Y61: L32



FIG. 2G

Mutagénesis de CDR L2 de cadena pesada de Y61

SEC ID Nº:		CDR L2							k_{off} ($\times 10^5$)
		50	51	52	53	54	55	56	
20	Y61	G	N	D	Q	R	P	S	
506		D	.	.	.	.	.	.	34,8
507		E	.	.	.	.	.	.	61,7
508		C	.	.	.	.	.	.	46,7
509		S	.	.	.	.	.	.	28,6
510		Y	.	.	.	.	.	.	17,4
511		H	.	.	.	.	.	.	76,1
512		K	.	.	.	.	.	.	242,5
513		R	.	.	.	.	.	.	44,4
514		N	.	.	.	.	.	.	30,5
515		Q	.	.	.	.	.	.	34,8
516		T	.	.	.	.	.	.	27,2
517		G	.	.	.	.	.	.	21,5
518		A	.	.	.	.	.	.	37,2
519		V	.	.	.	.	.	.	38,5
520		M	.	.	.	.	.	.	95,3
521		L	.	.	.	.	.	.	61,6
522		I	.	.	.	.	.	.	120,5
523		P	.	.	.	.	.	.	41,0
524		W	.	.	.	.	.	.	38,2
525		F	.	.	.	.	.	.	3,476,7
526		.	.	.	S	.	.	.	86,6
527		.	.	.	Y	.	.	.	73,3
528		.	.	.	R	.	.	.	61,4
529		.	.	.	Q	.	.	.	29,7
530		.	.	.	T	.	.	.	83,4
531		.	.	.	A	.	.	.	55,4
532		.	.	.	I	.	.	.	85,5
533		.	.	.	P	.	.	.	97,4

FIG. 2G-1
Mutagénesis de Y61: L50

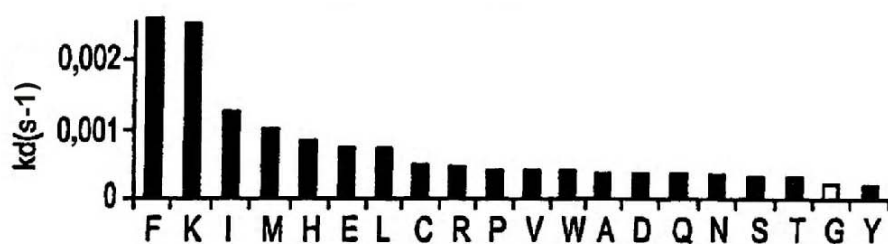


FIG. 2G-2
Mutagénesis de Y61: L53

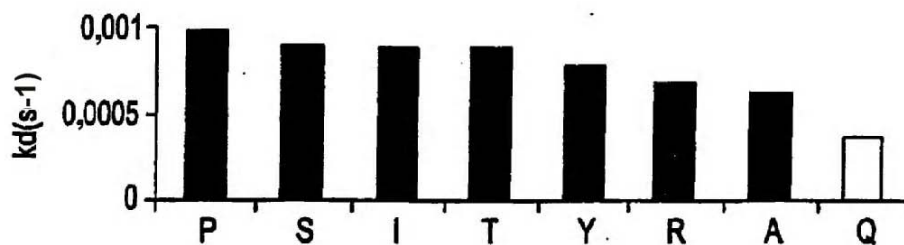


FIG. 2H

Mutagénesis de CDR L3 de cadena ligera de Y61

SEC ID Nº:	CDR L3													k_{off} ($\times 10^5$)
		89	90	91	92	93	94	95	95A	95B	95C	96	97	
18	Y61	Q	S	Y	D	R	G	T	H	P	A	L	L	
534		.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	25,9
535		.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	45,3
536		.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	30,7
537		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	51,1
538		.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	34,7
539		.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	42,7
540		.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	40,8
541		.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	34,9
542		.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	35,7
543		.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	72,8
544		.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	61,8
545		.	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	72,0
546		.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	44,9
547		.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	34,3
548		.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	32,0
549		.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	34,1
550		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	33,5
551		.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	19,9
552		.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	31,6
553		.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	30,0
554		.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	31,6
555		.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	39,2
556		.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	31,0
557		.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	28,9
558		.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	27,5
559		.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	30,0
560		.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	29,5
561		.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	34,9
562		.	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	34,9
563		.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	25,3
564		.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	52,0
565		.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	28,7
566		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	13,1
567		.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	18,7
568		.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	23,1
569		.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	13,7
570		.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	25,0
571		.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	30,5
572		.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	25,6
573		.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	52,6
574		.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	35,1
575		.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	24,4
576		.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	27,6
577		.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	33,2
578		.	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	29,3
579		.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	23,6

FIG. 2H-1
Mutagénesis de Y61: L92



FIG. 2H-2
Mutagénesis de Y61: L93



FIG. 2H-3
Mutagénesis de Y61: L94

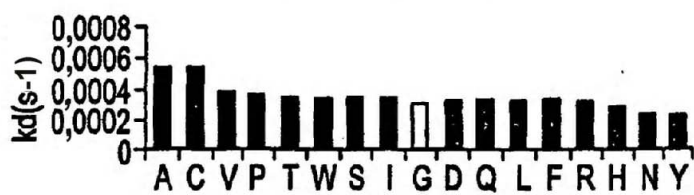


Figura 3: Eficacia *in vivo* de J695 en monos cynomolgus

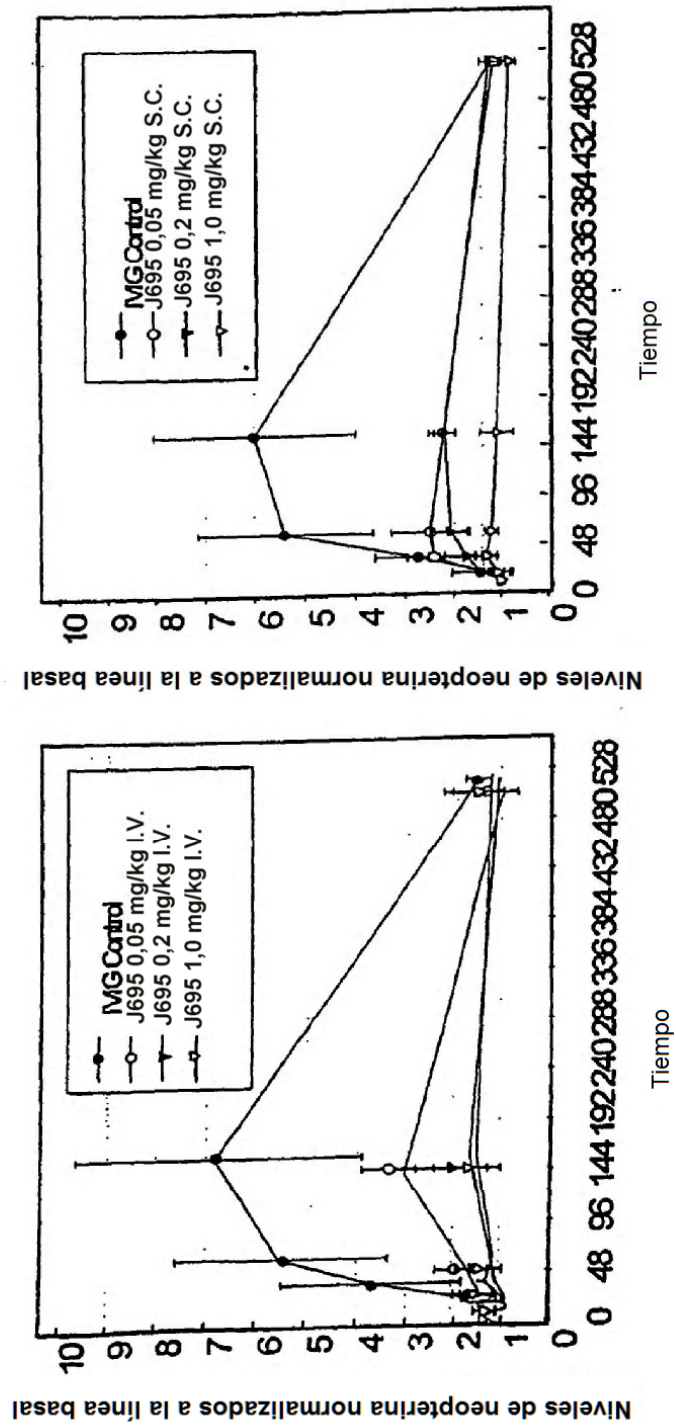


FIG. 4

