

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 800**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/09</b>	(2006.01) <b>A61P 13/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01) <b>A61P 15/08</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/04</b>	(2006.01) <b>A61P 17/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01) <b>A61P 17/06</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/10</b>	(2006.01) <b>A61P 19/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 7/06</b>	(2006.01) <b>A61P 19/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01) <b>A61P 21/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01) <b>A61P 25/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01) <b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 11/06</b>	(2006.01) <b>C07K 16/28</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2009 E 09816184 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2330193**

54 Título: **Molécula de anticuerpo mejorada contra el receptor de IL-6**

30 Prioridad:

**26.09.2008 JP 2008248213**  
**13.03.2009 JP 2009060806**  
**19.03.2009 JP 2009067925**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.09.2015**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)**  
**5-1, Ukima 5-chome Kita-ku**  
**Tokyo 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**IGAWA, TOMOYUKI;**  
**ISHII, SHINYA;**  
**MAEDA, ATSUHIKO;**  
**SAKURAI, MIKA;**  
**KOJIMA, TETSUO;**  
**TACHIBANA, TATSUHIKO;**  
**SHIRAIWA, HIROTAKE;**  
**TSUNODA, HIROYUKI y**  
**HIGUCHI, YOSHINOBU**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 546 800 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

Molécula de anticuerpo mejorada contra el receptor de IL-6

Campo técnico

5 La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-receptor de IL-6 como se define en las reivindicaciones como principio activo, métodos para producir las composiciones y semejantes. Además, la divulgación se refiere generalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-receptor de IL-6 como principio activo, métodos para producir las composiciones y semejantes.

Técnica anterior

10 Los anticuerpos están llamando la atención como productos farmacéuticos, ya que son altamente estables en plasma y tienen pocos efectos adversos. Entre ellos, están disponibles varios productos farmacéuticos de anticuerpo tipo IgG en el mercado y muchos productos farmacéuticos de anticuerpo están actualmente en desarrollo (Documentos no de patente 1 y 2). La IL-6 es una citocina que participa en diversas enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, tumores malignos, etc. (Documento no de patente 3). TOCILIZUMAB, un anticuerpo IgG1 anti-receptor de IL-6 humanizado, se une específicamente al receptor de IL-6. Se cree que TOCILIZUMAB puede usarse como agente terapéutico para enfermedades asociadas a IL-6 tales como artritis reumatoide, ya que neutraliza la actividad biológica de IL-6 (Documentos de patente 1 a 3 y Documentos no de patente 4 y 25). TOCILIZUMAB ha sido autorizado como agente terapéutico para enfermedad de Castleman y artritis reumatoide en Japón (Documento no de patente 5).

15 Los anticuerpos humanizados tales como TOCILIZUMAB son productos farmacéuticos de anticuerpos de primera generación. Los productos farmacéuticos de anticuerpos de segunda generación están siendo actualmente desarrollados mejorando la eficacia, conveniencia y coste de los productos farmacéuticos de anticuerpos de primera generación. Están siendo desarrolladas diversas tecnologías que son aplicables a los productos farmacéuticos de anticuerpos de segunda generación. Se ha informado de tecnologías para potenciar la función efectora, capacidad de unión al antígeno, farmacocinética y estabilidad, además de tecnologías para reducir el riesgo de inmunogenia (Documentos de patente 7 a 10). Para alterar la función del anticuerpo, especialmente modificaciones de aminoácidos han demostrado ser útiles (Documentos de patente 7, 10 y 11 y Documentos no de patente 26 y 27).

20 Como métodos para potenciar la eficacia del fármaco o reducir la dosificación se ha informado de tecnologías que potencian la actividad citotóxica mediada por célula dependiente de anticuerpo (actividad de ADCC) o actividad citotóxica dependiente del complemento (actividad CDC) mediante la sustitución de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo IgG (Documento no de patente 6). Además, se ha informado de la maduración por afinidad como una tecnología para potenciar la capacidad de unión al antígeno o capacidad de neutralización del antígeno (Documento no de patente 7). Esta tecnología permite potenciar la actividad de unión al antígeno introduciendo mutaciones de aminoácidos en la región determinante de la complementariedad (CDR) de una región variable o semejante. La potenciación de la capacidad de unión al antígeno mejora la actividad biológica *in vitro* o reduce la dosificación, y además mejora la eficacia *in vivo* (Documento no de patente 8). Actualmente, están siendo realizados ensayos clínicos para evaluar Motavizumab (producido por maduración por afinidad), que se espera tengan una eficacia superior a Palivizumab, un producto farmacéutico de anticuerpo anti-RSV de primera generación (Documento no de patente 9). Se ha informado de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 con una afinidad de aproximadamente 0,05 nM (es decir, mayor afinidad que la de TOCILIZUMAB) (Documento de patente 4). Sin embargo, no hay informe que describa un anticuerpo humano, humanizado o quimérico que tenga una afinidad superior a 0,05 nM.

30 Un problema encontrado con los actuales productos farmacéuticos de anticuerpo es el alto coste de producción asociado a cantidades extremadamente grandes de proteína que va a administrarse. Por ejemplo, se ha estimado que la dosificación de TOCILIZUMAB, un anticuerpo IgG1 anti-receptor de IL-6 humanizado, es aproximadamente 8 mg/kg/mes mediante inyección intravenosa (Documento no de patente 4). Su forma preferida de administración es la formulación subcutánea en enfermedades autoinmunitarias crónicas. En general, es necesario que las formulaciones subcutáneas sean formulaciones de alta concentración. Desde la perspectiva de la estabilidad o semejantes, el límite para las formulaciones de anticuerpo tipo IgG es generalmente aproximadamente 100 mg/ml (Documento no de patente 10). Pueden proporcionarse productos farmacéuticos de anticuerpos de segunda generación convenientes de bajo coste que pueden administrarse subcutáneamente en intervalos más largos aumentando la semivida de un anticuerpo en el plasma para prolongar su efecto terapéutico y así reducir la cantidad de proteína que va a administrarse, y confiriendo al anticuerpo alta estabilidad.

40 El FcRn participa estrechamente en la farmacocinética de los anticuerpos. Con respecto a las diferencias en la semivida en plasma de los isotipos de anticuerpo, se sabe que IgG1 e IgG2 tienen semivida en plasma superior a IgG3 e IgG4 (Documento no de patente 11). Como un método para mejorar adicionalmente la semivida en plasma de anticuerpos IgG1 e IgG2 que tienen semividas en plasma superiores, se ha informado de la sustitución de aminoácidos en la región constante que potencia la unión a FcRn (Documentos no de patente 12 y 13). Desde el punto de vista de la inmunogenia,

55

la mejora adicional de la semivida en plasma se realiza sustituyendo aminoácidos preferentemente en la región variable en vez de en la región constante (Documento de patente 5). Sin embargo, no hay informes hasta la fecha sobre la mejora de la semivida en plasma de anticuerpos para el receptor de IL-6 mediante la alteración de la región variable.

5 Otro problema importante encontrado en el desarrollo de productos biofarmacéuticos es la inmunogenia. En general, la inmunogenia de anticuerpos de ratón se reduce por la humanización de anticuerpos. Se supone que el riesgo de inmunogenia puede reducirse adicionalmente usando una secuencia de la región estructural de la línea germinal como molde en la humanización de anticuerpos (Documento no de patente 14). Sin embargo, incluso Adalimumab, un anticuerpo anti-TNF completamente humano, mostró alta frecuencia (13 % al 17 %) de inmunogenia, y se encontró que el efecto terapéutico se reducía en pacientes que mostraron inmunogenia (Documentos no de patente 15 y 16). Pueden estar presentes epítomos de linfocitos T incluso en la CDR de anticuerpos humanos, y estos epítomos de linfocitos T en CDR son una causa posible de inmunogenia. Se ha informado de métodos por ordenador e *in vitro* para predecir epítomos de linfocitos T (Documentos no de patente 17 y 18). Se supone que el riesgo de inmunogenia puede reducirse eliminando epítomos de linfocitos T predichos usando tales métodos (Documento no de patente 19).

15 TOCILIZUMAB, un anticuerpo IgG1 anti-receptor de IL-6 humanizado, es un anticuerpo IgG1 obtenido inmunizando el anticuerpo de ratón PM1. El injerto de CDR se lleva a cabo usando las secuencias NEW y REI humanas como región estructural de molde para las cadenas H y L, respectivamente; sin embargo, cinco aminoácidos de la secuencia de ratón son retenidos en la región estructural como aminoácidos esenciales para mantener la actividad (Documento no de patente 20). No hay informe previo que humanice completamente la secuencia de ratón restante en la región estructural del anticuerpo humanizado TOCILIZUMAB sin reducir la actividad. Además, la secuencia de CDR de TOCILIZUMAB es una secuencia de ratón, y así, como Adalimumab, puede tener epítomos de linfocitos T en la CDR, que pueden tener un posible riesgo de inmunogenia. En ensayos clínicos de TOCILIZUMAB, anticuerpos anti-TOCILIZUMAB no se detectaron a la dosis eficaz de 8 mg/kg, pero se observaron a las dosis de 2 mg/kg y 4 mg/kg (Documento de patente 6). Éstos sugieren que todavía puede mejorarse la inmunogenia de TOCILIZUMAB. Sin embargo, no ha habido informe sobre reducir el riesgo de inmunogenia de TOCILIZUMAB por la sustitución de aminoácidos.

25 El isotipo de TOCILIZUMAB es IgG1. La diferencia de isotipo se refiere a la diferencia en la secuencia de la región constante. Como se supone que la secuencia de la región constante tiene fuerte influencia sobre la función efectora, farmacocinética, propiedades físicas, etc., la selección de la secuencia de la región constante es muy importante para el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpo (Documento no de patente 11). En los últimos años, la seguridad de productos farmacéuticos de anticuerpos ha sido de gran importancia. La interacción entre la porción Fc del anticuerpo y el receptor de Fc $\gamma$  (función efectora) puede haber causado graves efectos adversos en ensayos clínicos de fase I de TGN1412 (Documento no de patente 21). Para productos farmacéuticos de anticuerpo diseñados para neutralizar la actividad biológica de un antígeno, la unión al receptor de Fc $\gamma$ , que es importante para las funciones efectoras tales como ADCC, es innecesaria. La unión al receptor de Fc $\gamma$  puede incluso ser desfavorable desde el punto de vista de los efectos adversos. Un método para reducir la unión al receptor de Fc $\gamma$  es alterar el isotipo de un anticuerpo IgG de IgG1 a IgG2 o IgG4 (Documento no de patente 22). IgG2 es más favorable que IgG4 desde el punto de vista de la farmacocinética y la unión al receptor I de Fc $\gamma$  (Documento no de patente 11). TOCILIZUMAB es un anticuerpo neutralizante para el receptor de IL-6, y su isotipo es IgG1. Así, en vista de los posibles efectos adversos, IgG2 puede ser un isotipo preferido ya que no se necesita funciones efectoras tales como ADCC.

40 Mientras tanto, cuando se desarrollan productos farmacéuticos de anticuerpo, las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, en particular, homogeneidad y estabilidad, son muy cruciales. Se ha informado que para el isotipo IgG2 hay heterogeneidad significativa derivada de los enlaces disulfuro en la región bisagra (Documento no de patente 23). No es fácil y sería más costoso fabricarlos como productos farmacéuticos a gran escala mientras que se mantiene la heterogeneidad relacionada con sustancias objetivo/sustancias relacionadas derivada de enlaces disulfuro entre producciones. Así, son deseables sustancias individuales en la medida de lo posible. Además, para la heterogeneidad de las secuencias del extremo C de cadenas H de un anticuerpo se ha informado de la delección del residuo de lisina de aminoácidos del extremo C, y la amidación del grupo carboxilo del extremo C debido a la delección de ambos aminoácidos del extremo C, glicina y lisina (Documento no de patente 24). En el desarrollo de anticuerpos de isotipo IgG2 como productos farmacéuticos es preferible reducir tal heterogeneidad y mantener alta estabilidad. Para producir formulaciones subcutáneamente administradas de alta concentración estables convenientes es preferible que no solo la estabilidad sea alta, sino también que la semivida en plasma sea superior a la de IgG1 que es el isotipo de TOCILIZUMAB. Sin embargo, no hay informe previo sobre las secuencias de la región constante para anticuerpos con la región constante del isotipo IgG2 que tengan heterogeneidad reducida, alta estabilidad y semivida en plasma superior a la de los anticuerpos con la región constante de isotipo IgG1.

A continuación se muestran los documentos del estado de la técnica relacionados con la divulgación:

55 [Documentos del estado de la técnica]

[Documentos de patente]

- [Documento de patente 1] WO 92/19759
- [Documento de patente 2] WO 96/11020
- [Documento de patente 3] WO 96/12503
- [Documento de patente 4] WO 2007/143168
- 5 [Documento de patente 5] WO 2007/114319
- [Documento de patente 6] WO 2004/096273
- [Documento de patente 7] EP 2206775
- [Documento de patente 8] EP 2194066
- [Documento de patente 9] EP 2275443
- 10 [Documento de patente 10] EP 2202245
- [Documento de patente 11] JP 2163096
- [Documentos no de patente]
- [Documento no de patente 1] Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, *Nature Biotechnology* 23, 1073 - -1078 (2005).
- 15 [Documento no de patente 2] Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., *Eur J Pharm Biopharm.* 2005 Apr; 59(3):389-96.
- [Documento no de patente 3] Nishimoto N, Kishimoto T., Interleukin 6: from bench to bedside., *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 Nov; 2(11):619-26.
- 20 [Documento no de patente 4] Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Broll J, Balint G, Emery P, Raemen F, Petersen J, Smolen J, Thomson D, Kishimoto T; CHARISMA Study Group., Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, Tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate., *Arthritis Rheum.* 2006 Sep; 54(9):2817-29.
- [Documento no de patente 5] Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood.* 2005 Oct 15; 106(8):2627-32.
- 25 [Documento no de patente 6] Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., *Mol Cells.* 2005 Aug 31; 20(1):17-29. Review.
- [Documento no de patente 7] Rothe A, Hosse RJ, Power BE. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. *Expert Opin Biol Ther.* 2006 Feb; 6(2):177-87.
- 30 [Documento no de patente 8] Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Jun 14; 102(24):8466-71. Publicación electrónica de 6 de junio de 2005.
- [Documento no de patente 9] Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. *J Mol Biol.* 2007, 368, 652-665.
- 35 [Documento no de patente 10] Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. *J Pharm Sci.* 2004 Jun; 93(6):1390-402.
- [Documento no de patente 11] Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. *Nat Biotechnol.* 2007 Dec; 25(12):1369-72.
- 40 [Documento no de patente 12] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., *J Immunol.* 2006 Jan 1; 176(1):346-56.
- [Documento no de patente 13] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES.,

Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., *Nat Biotechnol.* 1997 Jul; 15(7):637-40.

[Documento no de patente 14] Hwang WY, Almagro JC, Buss TN, Tan P, Foote J. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods.* 2005 May; 36(1):35-42.

5 [Documento no de patente 15] Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak P, Wolbink GJ. Clinical response to adalimumab: The relationship with anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007 Mar 9; [Publicación electrónica antes de impresión]

[Documento no de patente 16] Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int.* 2007 Jan; 27(3):269-74.

10 [Documento no de patente 17] Van Walle I, Gansemans Y, Parren PW, Stas P, Lasters I. Immunogenicity screening in protein drug development. *Expert Opin Biol Ther.* 2007 Mar; 7(3):405-18.

[Documento no de patente 18] Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP. Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2005 May; 3(5):991-1000.

15 [Documento no de patente 19] Chirino AJ, Ary ML, Marshall SA. Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov Today.* 2004 Jan 15; 9(2):82-90.

[Documento no de patente 20] Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, Bendig MM. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* 1993 Feb 15; 53(4):851-6.

20 [Documento no de patente 21] Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned future directions. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Jan; 6(1):75-92.

[Documento no de patente 22] Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol.* 1998 Jun; 76(6):231-48.

25 [Documento no de patente 23] Dilion TM, Ricci MS, Vezina C, Flynn GC, Liu YD, Rehder DS, Plant M, Henkle B, Li Y, Deechongkit S, Varnum B, Wypych J, Balland A, Bondarenko PV. Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem.* 2008 Jun 6; 283(23):16206-15.

[Documento no de patente 24] Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, Porter TJ, Rouse JC. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. *Anal Biochem.* 2007 Jan 1; 360(1):75-83.

30 [Documento no de patente 25] Yoshiyuki O, *Gekkan Pharm Stage* 2007; 7(5):13-18.

[Documento no de patente 26] Onda M, et al., Lowering the isoelectric point of the Fv portion of recombinant immunotoxins leads to decreased nonspecific animal toxicity without affecting antitumor activity., *Cancer Res.* 2001; 61:5070-77.

35 [Documento no de patente 27] Ito W. et al., The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementary-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values. *FEBS Letter* 1992; 309(1):85-88.

#### Divulgación de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

40 La invención se logró en vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo desvelado en el presente documento es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de segunda generación que son superiores al anticuerpo IgG1 anti-receptor de IL-6 humanizado TOCILIZUMAB, alterando las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y constantes de TOCILIZUMAB para potenciar la capacidad neutralizante del antígeno y mejorar la farmacocinética, de forma que se ejerza efecto terapéutico prolongado con una menor frecuencia de administración, y se mejoren la inmunogenia, seguridad y propiedades fisicoquímicas (estabilidad y homogeneidad) (más adelante en el

45 presente documento estas composiciones farmacéuticas también pueden denominarse los "agentes" o las "formulaciones"). Otro objetivo es proporcionar métodos para producir tales composiciones farmacéuticas.

[Medios para resolver los problemas]

5 Se realizaron estudios dedicados para generar moléculas de segunda generación como se define en las reivindicaciones que son superiores al anticuerpo IgG1 anti-receptor de IL-6 humanizado de primera generación TOCILIZUMAB, alterando las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y constantes de TOCILIZUMAB para potenciar la eficacia y mejorar la farmacocinética, de manera que se ejerciera un efecto terapéutico prolongado con una menor frecuencia de administración, y mejoraran la inmunogenia, seguridad y propiedades fisicoquímicas (estabilidad y homogeneidad). Como resultado, se descubrieron múltiples mutaciones de CDR en las regiones variables de TOCILIZUMAB que mejoran la capacidad de unión (afinidad) por el antígeno. Así, la afinidad mejoró satisfactoriamente significativamente usando una combinación de tales mutaciones. También tuvo éxito mejorar la farmacocinética introduciendo modificaciones que reducen el punto isoelectrico de la secuencia de la región variable.

10 También tuvo éxito mejorar la farmacocinética haciendo que la unión al antígeno del receptor de IL-6 fuera dependiente del pH, de manera que una única molécula de anticuerpo pudiera neutralizar el antígeno múltiples veces. Además, el riesgo de inmunogenia se ha reducido satisfactoriamente humanizando completamente las secuencias derivadas de ratón que quedan en la región estructural de TOCILIZUMAB y reduciendo el número de péptidos de epítomos de linfocitos T en las regiones variables predichas por ordenador. Además, también se han descubierto satisfactoriamente secuencias novedosas de la región constante para la región constante de TOCILIZUMAB, que reducen la unión al receptor de Fc $\gamma$  en comparación con IgG1 para mejorar la seguridad, mejoran la farmacocinética en comparación con IgG1 y reducen la heterogeneidad debido a los enlaces disulfuro en la región bisagra de IgG2 y la heterogeneidad debido al extremo C de la cadena H sin disminuir la estabilidad. Moléculas de segunda generación que son superiores a TOCILIZUMAB se han producido satisfactoriamente combinando apropiadamente estas alteraciones de secuencias de aminoácidos en las CDR, regiones variables y regiones constantes.

15 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo IgG anti-receptor de IL-6 humanizado que tiene capacidad de unión al antígeno (receptor de IL-6) superior, farmacocinética superior, seguridad y propiedades físicas superiores (estabilidad y homogeneidad), y adicionalmente riesgo reducido de inmunogenia, alterando las secuencias de aminoácidos de regiones variables y constantes del anticuerpo IgG1 anti-receptor de IL-6 humanizado TOCILIZUMAB; y métodos para producir tales composiciones farmacéuticas. Más específicamente, la invención proporciona:

[1] un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de uno cualquiera de:

30 (a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20 (región variable de VH3-M73) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 (región variable de VL3);

(b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (región variable de VH4-M73) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 (región variable de VL1); y

35 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21 (región variable de VH5-M83) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24 (región variable de VL5);

[2] un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de uno cualquiera de:

40 (a) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (VH3-M73) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 (VL3);

(b) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25 (VH4-M73) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 (VL1); y

(c) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27 (VH5-M83) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30 (VL5);

[3] un gen que codifica el anticuerpo de [1] o [2];

45 [4] un vector que lleva el gen de [3];

[5] una célula huésped que lleva el vector de [4];

[6] un método para producir el anticuerpo de [1] o [2] cultivando la célula huésped de [5]; y [6] una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de [1] o [2] o un anticuerpo producido por el método de [6].

[Efectos de la invención]

Los anticuerpos IgG anti-receptor de IL-6 humanizados obtenidos según la divulgación tienen eficacia potenciada y farmacocinética mejorada; así, pueden ejercer un efecto terapéutico prolongado con menos frecuencia de administración.

Breve descripción de los dibujos

5 La Fig. 1 es un listado de sitios de mutación que mejoran la afinidad de TOCILIZUMAB por el receptor de IL-6. La secuencia de HCDR2 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 81; la secuencia de HCDR2 después de la mutación (línea superior) se muestra en SEQ ID NO: 82; la secuencia de HCDR2 después de la mutación (línea inferior) se muestra en SEQ ID NO: 83; la secuencia de HCDR3 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 84; la secuencia de HCDR3 después de la mutación (línea superior) se muestra en SEQ ID NO: 85; la secuencia de HCDR3 después de la mutación (línea inferior) se muestra en SEQ ID NO: 86; la secuencia de LCDR1 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 87; 10 la secuencia de LCDR1 después de la mutación (línea superior) se muestra en SEQ ID NO: 88; la secuencia de LCDR1 después de la mutación (línea inferior) se muestra en SEQ ID NO: 89; la secuencia de LCDR3 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 90; la secuencia de LCDR3 después de la mutación (línea superior) se muestra en SEQ ID NO: 91; y la secuencia de LCDR3 después de la mutación (línea inferior) se muestra en SEQ ID NO: 92.

La Fig. 2 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de TOCILIZUMAB y RDC-23 en BaF/gp130.

15 La Fig. 3 es un listado de sitios de mutación que pueden reducir el punto isoeléctrico de la región variable sin reducir significativamente la unión de TOCILIZUMAB al receptor de IL-6. El asterisco en el dibujo representa un sitio que no tiene influencia sobre el punto isoeléctrico, pero que se mutó para la conversión en una secuencia humana. La secuencia de HFR1 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 93; la secuencia de HFR1 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 94; la secuencia de HCDR1 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 95; la secuencia de HCDR1 20 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 96; la secuencia de HFR2 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 97; la secuencia de HFR2 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 98; la secuencia de HCDR2 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 81; la secuencia de HCDR2 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 99; la secuencia de HFR4 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 100; la secuencia de HFR4 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 101; la secuencia de LFR1 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 102; la 25 secuencia de LFR1 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 103; la secuencia de LCDR1 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 87; la secuencia de LCDR1 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 104; la secuencia de LFR2 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 105; la secuencia de LFR2 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 106; la secuencia de LCDR2 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 107; la secuencia de LCDR2s después de la mutación se muestran en SEQ ID NO: 108 y 109; la secuencia de LFR3 de TOCILIZUMAB se 30 muestra en SEQ ID NO: 110; la secuencia de LFR3 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 111; la secuencia de LFR4 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 112; y la secuencia de LFR4 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 113.

La Fig. 4 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de TOCILIZUMAB y H53/L28 en BaF/gp130.

35 La Fig. 5 es una gráfica que muestra los transcurros de tiempo de la concentración plasmática para TOCILIZUMAB y H53/L28 en ratones después de la administración intravenosa.

La Fig. 6 es una gráfica que muestra los transcurros de tiempo de la concentración plasmática para TOCILIZUMAB y H53/L28 en ratones después de la administración subcutánea.

La Fig. 7 es una ilustración esquemática que muestra que una molécula de IgG puede unirse de nuevo a otro antígeno por disociación de un antígeno tipo membrana en el endosoma.

40 La Fig. 8 es un listado de sitios de mutación que puede conferir dependencia del pH a la unión de TOCILIZUMAB al receptor de IL-6 (unión a pH 7,4 y disociación a pH 5,8). La secuencia de HFR1 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 93; la secuencia de HFR1 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 114; la secuencia de HCDR1 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 95; la secuencia de HCDR1 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 115; la secuencia de LCDR1 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 87; la secuencia de LCDR1 después de 45 la mutación se muestra en SEQ ID NO: 116; la secuencia de LCDR2 de TOCILIZUMAB se muestra en SEQ ID NO: 107; y la secuencia de LCDR2 después de la mutación se muestra en SEQ ID NO: 117.

La Fig. 9 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de TOCILIZUMAB y H3p/L73 en BaF/gp130.

La Fig. 10 es una gráfica que muestra los transcurros de tiempo de concentración plasmática para TOCILIZUMAB y H3p/L73 en monos cinomolgos después de la administración intravenosa.

50 La Fig. 11 es una gráfica que muestra los transcurros de tiempo de concentración plasmática para TOCILIZUMAB y H3p/L73 en ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano después de la administración intravenosa.

La Fig. 12 es un diagrama que muestra el resultado de la evaluación de la heterogeneidad derivada del extremo C de

TOCILIZUMAB, TOCILIZUMABΔK y TOCILIZUMABΔGK por cromatografía de intercambio catiónico.

La Fig. 13 es un diagrama que muestra el resultado de la evaluación de la heterogeneidad derivada del enlace disulfuro de TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-IgG2 y TOCILIZUMAB-SKSC por cromatografía de intercambio catiónico.

5 La Fig. 14 es un diagrama que muestra las curvas de desnaturalización para TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-IgG2 y TOCILIZUMAB-SKSC obtenidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el valor de Tm para cada dominio de Fab.

La Fig. 15 es una gráfica que muestra los transcurros de tiempo de concentración plasmática para TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 y TOCILIZUMAB-M73 en ratones transgénicos para FcRn humano después de la administración intravenosa.

La Fig. 16 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de TOCILIZUMAB, control y Fv5-M83 en BaF/gp130.

10 La Fig. 17 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de TOCILIZUMAB, Fv3-M73 y Fv4-M73 en BaF/gp130.

La Fig. 18 es una gráfica que muestra los transcurros de tiempo de concentraciones plasmáticas para TOCILIZUMAB, control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 en monos cinomolgos después de la administración intravenosa.

15 La Fig. 19 es una gráfica que muestra los transcurros de tiempo de concentración de CRP para TOCILIZUMAB, control, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83 en monos cinomolgos después de la administración intravenosa.

La Fig. 20 es una gráfica que muestra los transcurros de tiempo del porcentaje de receptor de IL-6 soluble libre en monos cinomolgos después de la administración intravenosa de TOCILIZUMAB, control, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83.

La Fig. 21 es una gráfica que muestra los efectos inhibidores por TOCILIZUMAB y Fv4-M73 sobre la producción de MCP-1 de células sinoviales derivadas de pacientes con AR humanos.

20 La Fig. 22 es una gráfica que muestra los efectos inhibidores por TOCILIZUMAB y Fv4-M73 sobre la producción de VEGF de células sinoviales derivadas de pacientes con AR humanos.

Modo para llevar a cabo la invención

La invención proporciona anticuerpos como se reivindican. La divulgación también se refiere a los polipéptidos de (a) a (f) a continuación:

25 (a) un polipéptido que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 (CDR1 de VH4-M73), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 (CDR2 de VH4-M73) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 (CDR3 de VH4-M73);

30 (b) un polipéptido que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 (CDR1 de VH3-M73), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (CDR2 de VH3-M73) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6 (CDR3 de VH3-M73);

(c) un polipéptido que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 (CDR1 de VH5-M83), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 (CDR2 de VH5-M83) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 (CDR3 de VH5-M83);

35 (d) un polipéptido que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 (CDR1 de VL1), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (CDR2 de VL1) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 (CDR3 de VL1);

(e) un polipéptido que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 (CDR1 de VL3), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14 (CDR2 de VL3) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 (CDR3 de VL3); y

40 (f) un polipéptido que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 (CDR1 de VL5), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17 (CDR2 de VL5) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18 (CDR3 de VL5).

45 Los polipéptidos descritos en el presente documento no están particularmente limitados; sin embargo, son preferentemente sustancias de unión al antígeno que tienen la actividad de unión al receptor de IL-6 humano. Tales sustancias de unión al antígeno incluyen preferentemente, por ejemplo, regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo (VH), regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo (VL), cadenas pesadas del anticuerpo, cadenas ligeras del anticuerpo y anticuerpos.

De los polipéptidos de (a) a (f) anteriores, los polipéptidos de (a) a (c) son ejemplos preferidos de regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo, mientras que los polipéptidos de (d) a (f) son ejemplos preferidos de regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo.

Estas regiones variables pueden usarse como una porción de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano en los que una región variable tal se usa tienen actividad de unión superior, farmacocinética excelente, seguridad excelente, reducida inmunogenia y/o propiedades fisicoquímicas superiores. En la divulgación, farmacocinética excelente o mejora de la farmacocinética se refiere a uno cualquiera de: disminución en la "eliminación (CL)", aumento en el "área bajo la curva (ABC)", aumento en el "tiempo de residencia medio" y aumento en la "semivida en plasma (t1/2)", que son parámetros farmacocinéticos calculados a partir del transcurso de tiempo de la concentración plasmática cuando un anticuerpo va a administrarse en el cuerpo. En el presente documento, propiedad fisicoquímica superior o propiedad fisicoquímica mejorada se refiere a, pero no se limita a, estabilidad mejorada, heterogeneidad disminuida, o similares.

Las regiones estructurales de anticuerpos humanos (FR) que van a ligarse con CDR están seleccionados de manera que la CDR forme un sitio de unión al antígeno favorable. Las FR que van a usarse para las regiones variables como se describen en el presente documento no están particularmente limitadas y puede usarse cualquier FR; sin embargo, preferentemente se usan FR derivadas de ser humano. Es posible usar FR derivadas de ser humano que tienen una secuencia natural. Alternativamente, si se necesita, pueden introducirse sustitución, delección, adición y/o inserción o semejantes de uno o más aminoácidos en la región estructural que tiene una secuencia natural de manera que la CDR forme un sitio de unión al antígeno adecuado. Pueden seleccionarse secuencias de FR mutantes que tienen una propiedad deseada, por ejemplo, midiendo y evaluando la actividad de unión a un antígeno para un anticuerpo con una FR con sustituciones de aminoácidos (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Además, uno o más aminoácidos pueden estar sustituidos, delecionados, añadidos y/o insertados en la secuencia de CDR descrita anteriormente. Se prefiere que una secuencia de CDR después de la sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos tenga actividad equivalente a la secuencia de CDR antes de la alteración con respecto a la actividad de unión, actividad neutralizante, estabilidad, inmunogenia y/o farmacocinética. El número de aminoácidos que va a sustituirse, delecionarse, añadirse y/o insertarse no está particularmente limitado; sin embargo, es preferentemente tres aminoácidos o menos, más preferentemente dos aminoácidos o menos, y todavía más preferentemente un aminoácido por CDR.

Métodos para sustituir uno o más residuos de aminoácidos con otros aminoácidos de interés incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275; Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12,9441-9456; Kramer W, and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 82,488-492). Este método puede usarse para sustituir aminoácidos deseados en un anticuerpo con otros aminoácidos de interés. Además, los aminoácidos en las regiones estructurales y CDR pueden estar sustituidos con otros aminoácidos apropiados usando técnicas de bibliotecas tales como barajado de la región estructural (Mol. Immunol. 2007 Apr; 44(11): 3049-60) y reparación de CDR (documento US 2006/0122377).

La divulgación también se refiere a los anticuerpos de (a) a (c) a continuación:

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 (CDR1 de VH4-M73), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 (CDR2 de VH4-M73) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3 (CDR3 de VH4-M73), y una región variable de la cadena ligera que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 (CDR1 de VL1), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 (CDR2 de VL1) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 (CDR3 de VL1);

(b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 (CDR1 de VH3-M73), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 (CDR2 de VH3-M73) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6 (CDR3 de VH3-M73), y una región variable de la cadena ligera que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 (CDR1 de VL3), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14 (CDR2 de VL3) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 (CDR3 de VL3); y

(c) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 (CDR1 de VH5-M83), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 (CDR2 de VH5-M83) y CDR3 que comprende la secuencia de (SEQ ID NO: 9 (CDR3 de VH5-M83), y una

región variable de la cadena ligera que comprende CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 (CDR1 de VL5), CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17 (CDR2 de VL5) y CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18 (CDR3 de VL5).

5 Los anticuerpos descritos anteriormente pueden usarse como anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano que tienen actividad de unión superior, farmacocinética excelente, seguridad excelente, inmunogenia reducida y/o propiedades fisicoquímicas superiores.

10 Regiones estructurales de anticuerpos humanos que van a asociarse a CDR como se describe en el presente documento se seleccionan de manera que la CDR forme un sitio de unión al antígeno favorable. Las FR que van a usarse para las regiones variables de la divulgación no están particularmente limitadas, y puede usarse cualquier FR; sin embargo, preferentemente se usa FR derivada de ser humano. Es posible usar FR derivadas de ser humano que tienen una secuencia natural. Alternativamente, si se necesita, pueden introducirse sustitución, delección, adición y/o inserción o semejantes de uno o más aminoácidos en la región estructural que tiene una secuencia natural de manera que la CDR forme un sitio de unión al antígeno adecuado. Secuencias de FR mutantes que tienen una propiedad deseada pueden seleccionarse, por ejemplo, midiendo y evaluando la actividad de unión a un antígeno para un anticuerpo que tiene una  
15 FR con sustituciones de aminoácidos (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

20 Mientras tanto, la región constante que va a usarse para un anticuerpo descrito en el presente documento no está particularmente limitada, y puede usarse cualquier región constante. Regiones constantes preferidas que van a usarse para los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, regiones constantes derivadas de ser humano (regiones constantes derivadas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, Cκ, Cλ y semejantes). Uno o más aminoácidos pueden estar sustituidos, delecionados, añadidos y/o insertados en las regiones constantes derivadas de ser humano. Las regiones constantes de la cadena pesada derivadas de ser humano preferidas incluyen, por ejemplo, regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 (región constante de VH4-M73), regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 (región constante VH3-M73) y regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 (región constante de VH5-M83), mientras que las regiones  
25 constantes de la cadena ligera derivadas de ser humano preferidas incluyen, por ejemplo, regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 (VL1), regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 (VL3) y regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 (VL5).

30 Además, uno o más aminoácidos pueden estar sustituidos, delecionados, añadidos y/o insertados en la secuencia de CDR descrita anteriormente. Se prefiere que una secuencia de CDR después de la sustitución, delección, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos tenga actividad equivalente a la secuencia de CDR antes de la alteración con respecto a la actividad de unión, actividad neutralizante, estabilidad, inmunogenia y/o farmacocinética. El número de aminoácidos que va a sustituirse, deleccionarse, añadirse y/o insertarse no está particularmente limitado; sin embargo, es preferentemente tres aminoácidos o menos, más preferentemente dos aminoácidos o menos, y todavía más  
35 preferentemente un aminoácido por CDR.

Los aminoácidos también pueden sustituirse, deleccionarse, añadirse y/o insertarse por los métodos descritos anteriormente.

La divulgación también proporciona las regiones variables de (a) a (f) a continuación:

40 (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (región variable de VH4-M73);

(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20 (región variable de VH3-M73);

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21 (región variable de VH5-M83);

45 (d) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 (región variable de VL1);

(e) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 (región variable de VL3); y

50 (f) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24 (región variable de VL5).

Las regiones variables descritas anteriormente pueden usarse como parte de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano en los que se usan tales regiones variables tienen actividad de unión

superior, farmacocinética excelente, seguridad excelente, inmunogenia reducida y/o propiedades fisicoquímicas superiores.

5 Las regiones variables descritas anteriormente también pueden comprender sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos (por ejemplo, cinco aminoácidos o menos, preferentemente tres aminoácidos o menos). Métodos para sustituir uno o más residuos de aminoácidos con otros aminoácidos de interés incluyen, por ejemplo, los métodos descritos anteriormente.

La divulgación también se refiere a polipéptidos que comprenden las regiones variables descritas anteriormente.

Además, la divulgación se refiere a los anticuerpos de (a) a (c) a continuación:

10 (a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (región variable de VH4-M73) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 (región variable de VL1);

(b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20 (región variable de VH3-M73) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 (región variable de VL3); y

15 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21 (región variable de VH5-M83) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24 (región variable de VL5).

20 Las regiones variables descritas anteriormente pueden usarse como parte de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano en los que se usan estas regiones variables tienen actividad de unión superior, farmacocinética excelente, seguridad excelente, inmunogenia reducida y/o propiedades físicas superiores.

Las regiones variables descritas anteriormente también pueden comprender sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos (por ejemplo, cinco aminoácidos o menos, preferentemente tres aminoácidos o menos). Métodos para sustituir uno o más residuos de aminoácidos con otros aminoácidos de interés incluyen, por ejemplo, los métodos descritos anteriormente.

25 Mientras tanto, la región constante que va a usarse para un anticuerpo desvelado en el presente documento no está particularmente limitada, y puede usarse cualquier región constante. Las regiones constantes preferidas que van a usarse para los anticuerpos de la presente invención incluyen, por ejemplo, regiones constantes derivadas de ser humano (regiones constantes derivadas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, cadena  $\kappa$ , cadena  $\lambda$  y semejantes). Uno o más aminoácidos pueden estar sustituidos, delecionados, añadidos y/o insertados en las regiones constantes derivadas de ser humano. Las  
30 regiones constantes de la cadena pesada derivadas de ser humano preferidas incluyen, por ejemplo, regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 (región constante de VH4-M73), regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 (región constante VH3-M73) y regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 (región constante de VH5-M83), mientras que las regiones constantes de la cadena ligera derivadas de ser humano preferidas incluyen, por ejemplo, regiones constantes que  
35 comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 (VL1), regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 (VL3) y regiones constantes que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 (VL5).

La divulgación también se refiere a las cadenas pesadas o ligeras de (a) a (f) a continuación:

40 (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25 (VH4-M73);

(b) una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (VH3-M73);

(c) una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27 (VH5-M83);

(d) una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 (VL1);

(e) una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 (VL3); y

(f) una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30 (VL5).

45 Las cadenas pesadas y cadenas ligeras descritas anteriormente pueden usarse como parte de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano en los que se usan estas cadenas pesadas y cadenas ligeras tienen actividad de unión superior, farmacocinética excelente, seguridad excelente, inmunogenia reducida y/o propiedades fisicoquímicas superiores.

Las cadenas pesadas y cadenas ligeras descritas anteriormente también pueden comprender sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos (por ejemplo, diez aminoácidos o menos, preferentemente cinco aminoácidos o menos, y más preferentemente tres aminoácidos o menos). Métodos para sustituir uno o más residuos de aminoácidos con otros aminoácidos de interés incluyen, por ejemplo, los métodos descritos anteriormente.

- 5 Pueden llevarse a cabo sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos para las regiones variables, regiones constantes, o ambas.

La divulgación también se refiere a los anticuerpos de (a) a (c) a continuación:

(a) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25 (VH4-M73) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 (VL1);

- 10 (b) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (VH3-M73) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 (VL3); y

(c) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27 (VH5-M83) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30 (VL5).

- 15 Los anticuerpos descritos anteriormente son anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano que tienen actividad de unión superior, farmacocinética excelente, seguridad excelente, inmunogenia reducida y/o propiedades fisicoquímicas superiores.

- 20 Los anticuerpos descritos anteriormente también pueden comprender sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 20 aminoácidos o menos, preferentemente diez aminoácidos o menos, y más preferentemente cinco aminoácidos o menos). Métodos para sustituir uno o más residuos de aminoácidos con otros aminoácidos de interés incluyen, por ejemplo, los métodos descritos anteriormente.

Pueden llevarse a cabo sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos para las regiones variables, regiones constantes, o ambas.

Los anticuerpos descritos en el presente documento son preferentemente anticuerpos humanizados.

- 25 Los anticuerpos humanizados también se denominan anticuerpos humanos reformados. Un anticuerpo humanizado tal se obtiene injertando una región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un mamífero no humano en la CDR de un anticuerpo humano. También se conocen técnicas de recombinación genética convencionales para la preparación de tales anticuerpos (véase la solicitud de patente europea nº EP 125023; y el documento WO 96/02576).

- 30 Específicamente, por ejemplo, una secuencia de ADN diseñada de forma que una CDR de interés y una región estructural (FR) de interés estén ligadas se sintetiza por PCR, usando varios oligonucleótidos preparados para tener porciones que se solapan con los extremos de tanto CDR como FR como cebadores (véase el método descrito en el documento WO 98/13388). Un anticuerpo humanizado se obtiene: ligando el ADN resultante a un ADN que codifica una región constante del anticuerpo humano o una región constante del anticuerpo humano modificado; insertando ésta en un vector de expresión; e introduciéndose ésta en un huésped para producir el anticuerpo (véase la solicitud de patente europea nº EP 239400 y la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 96/02576).

- 35 Regiones estructurales del anticuerpo humano que van a enlazarse con CDR se seleccionan de manera que la CDR forme un sitio de unión al antígeno favorable. Si se necesita, puede introducirse sustitución de aminoácidos, deleción, adición y/o inserción en la región estructural de una región variable del anticuerpo.

- 40 Una región constante de anticuerpo humano, o una región constante de anticuerpo humano alterada en la que uno o más aminoácidos se han sustituido, deleccionado, añadido y/o insertado en una región constante de anticuerpo humano, puede usarse como la región constante de un anticuerpo humanizado.

- 45 Por ejemplo, C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4, C $\mu$ , C $\delta$ , C $\alpha$ 1, C $\alpha$ 2 y C $\epsilon$  pueden usarse para la cadena H, y C $\kappa$  y C $\lambda$  pueden usarse para la cadena L. La secuencia de aminoácidos de C $\kappa$  se muestra en SEQ ID NO: 38, y la secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 37. La secuencia de aminoácidos de C $\gamma$ 1 se muestra en SEQ ID NO: 40, y la secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 39. La secuencia de aminoácidos de C $\gamma$ 2 se muestra en SEQ ID NO: 42, y la secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 41. La secuencia de aminoácidos de C $\gamma$ 4 se muestra en SEQ ID NO: 44, y la secuencia de nucleótidos que codifica esta secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 43.

- 50 Además, pueden modificarse las regiones C del anticuerpo humano para mejorar la estabilidad del anticuerpo o estabilidad de la producción de anticuerpos. Pueden usarse anticuerpos humanos de cualquier isotipo tales como IgG, IgM, IgA, IgE o IgD en la humanización de anticuerpos; sin embargo, IgG se usa preferentemente en el presente

documento.

Pueden usarse IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, o similares, como IgG.

5 Los aminoácidos en la región variable (por ejemplo, CDR y FR) y región constante de un anticuerpo humanizado pueden delecionarse, añadirse, insertarse y/o sustituirse con aminoácidos después de la preparación. Los anticuerpos descritos en el presente documento también incluyen tales anticuerpos humanizados que comprenden sustituciones de aminoácidos y similares.

10 Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen no solo anticuerpos divalentes como se ha representado por IgG, sino también anticuerpos monovalentes y anticuerpos multivalentes como se ha representado por IgM, en tanto que tengan actividad de unión al receptor de IL-6 y/o actividad neutralizante. Los anticuerpos multivalentes descritos en el presente documento incluyen anticuerpos multivalentes en los que los sitios de unión al antígeno son todos idénticos, y anticuerpos multivalentes en los que todos o algunos de los sitios de unión al antígeno son diferentes. Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen no solo moléculas de anticuerpo completo, sino también minicuerpos y productos modificados de los mismos, en tanto que se unan a la proteína del receptor de IL-6.

15 Los minicuerpos son anticuerpos que comprenden un fragmento de anticuerpo que carece de una porción de un anticuerpo completo (por ejemplo, IgG completa o semejante), y no están particularmente limitados, en tanto que tengan actividad de unión al receptor de IL-6 y/o actividad neutralizante y comprendan un fragmento de anticuerpo que carece de una porción de un anticuerpo completo (por ejemplo, IgG completa o semejante). Los minicuerpos descritos en el presente documento no están particularmente limitados, en tanto que comprendan una porción de un anticuerpo completo. Sin embargo, los minicuerpos comprenden preferentemente VH o VL, y particularmente preferentemente comprenden tanto VH como VL. Otros minicuerpos preferibles descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, minicuerpos que comprenden CDR de anticuerpo. Los minicuerpos pueden comprender todas o algunas de las seis CDR de un anticuerpo.

20 Los minicuerpos descritos en el presente documento tienen preferentemente un peso molecular más pequeño que los anticuerpos completos. Sin embargo, los minicuerpos pueden formar multímeros, por ejemplo, dímeros, trímeros o tetrámeros, y así su peso molecular es algunas veces superior al de anticuerpos completos.

Específicamente, los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Mientras tanto, los minicuerpos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv (Fv monocatenario), diacuerpos y sc(Fv)<sub>2</sub> ((Fv)<sub>2</sub> monocatenario). Los multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros y polímeros) de estos anticuerpos también están incluidos en los minicuerpos descritos en el presente documento.

30 Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, tratando anticuerpos con enzimas para producir fragmentos de anticuerpos. Enzimas conocidas por generar fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, papaína, pepsina y plasmina. Alternativamente, un gen que codifica tal fragmento de anticuerpo puede construirse, introducirse en un vector de expresión y expresarse en células huésped apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178,476-496; Pluckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121,652-663; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669; Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9,132-137).

Las enzimas digestivas escinden en sitios específicos de un fragmento de anticuerpo, dando fragmentos de anticuerpos de las estructuras específicas mostradas a continuación. Pueden aplicarse técnicas de ingeniería genética a tales fragmentos de anticuerpos enzimáticamente obtenidos para delecionar una porción arbitraria del anticuerpo.

40 Fragmentos de anticuerpos obtenidos usando las enzimas anteriormente digestivas son los siguientes.

Digestión con papaína: F(ab)<sub>2</sub> o Fab

Digestión con pepsina: F(ab')<sub>2</sub> o Fab'

Digestión con plasmina: Facb

45 Los minicuerpos descritos en el presente documento incluyen fragmentos de anticuerpos que carecen de una región arbitraria, en tanto que tengan actividad de unión al receptor de IL-6 y/o actividad neutralizante.

50 "Diacuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo bivalente construido por fusión génica (Holliger P et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; documentos EP 404.097; WO 93/11161, etc.). Los diacuerpos son dímeros compuestos de dos cadenas de polipéptidos. En cada una de las cadenas de polipéptidos que forman un dímero, un VL y un VH están generalmente ligados por un conector en la misma cadena. En general, un conector en un diacuerpo es suficientemente corto de forma que VL y VH no puedan unirse entre sí. Específicamente, el número de residuos de aminoácidos que constituyen el conector es, por ejemplo, aproximadamente cinco residuos. Así, VL y VH codificadas

sobre el mismo polipéptido no pueden formar un fragmento de la región variable monocatenaria, y formarán un dímero con otro fragmento de la región variable monocatenaria. Como resultado, el dímero tiene dos sitios de unión al antígeno.

5 Los anticuerpos scFv son polipéptidos monocatenarios producidos enlazando VH y VL mediante un conector o semejante (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883; Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, eds., Resenburt and Moore, Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)). La región V de la cadena H y la región V de la cadena L de scFv pueden derivarse de cualquier anticuerpo descrito en el presente documento. El conector peptídico para enlazar las regiones V no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede usarse un péptido monocatenario arbitrario que contiene aproximadamente tres a 25 residuos como conector. Específicamente, 10 es posible usar los conectores peptídicos descritos más adelante o semejantes.

Las regiones V de las dos cadenas pueden ligarse, por ejemplo, por PCR como se ha descrito anteriormente. Primero, un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos completa o una secuencia de aminoácidos parcial deseada de uno de los ADN mostrados a continuación se usa como molde para enlazar las regiones V por PCR:

una secuencia de ADN que codifica una cadena H o región V de la cadena H de un anticuerpo, y

15 una secuencia de ADN que codifica una cadena L o región V de la cadena L de un anticuerpo.

Los ADN que codifican la región V de una cadena H o cadena L se amplifican por PCR usando un par de cebadores que contienen secuencias correspondientes de los dos extremos del ADN que va a amplificarse. Entonces, se prepara un ADN que codifica la porción de conector peptídico. El ADN que codifica el conector peptídico también puede sintetizarse por PCR. Una secuencia de nucleótidos que puede usarse para enlazar los productos de amplificación sintetizados por separado de la región V se añade al extremo 5' de los cebadores que van a usarse. Entonces, se lleva a cabo PCR usando cada uno de los ADN en [ADN de la región V de la cadena H]-[ADN de conector peptídico]-[ADN de la región V de la cadena L] y cebadores de PCR de ensamblaje. 20

Los cebadores de PCR de ensamblaje contienen una combinación de un cebador que se hibrida con el extremo 5' del [ADN de la región V de la cadena H] y un cebador que se hibrida con el extremo 3' del [ADN de la región V de la cadena L]. En otras palabras, los cebadores de PCR de ensamblaje son un conjunto de cebadores que pueden usarse para amplificar ADN que codifica la secuencia de longitud completa del scFv que va a sintetizarse. Mientras tanto, las secuencias nucleicas que pueden usarse para enlazar cada uno de los ADN de la región V se añaden al [ADN de conector peptídico]. Entonces, estos ADN se enlazan, y entonces el scFv completo se genera por último lugar como un producto de amplificación usando el cebadores de PCR de ensamblaje. Una vez se generan los ADN que codifican scFv, los vectores de expresión que contienen estos ADN y células recombinantes transformadas con estos vectores de expresión pueden obtenerse por métodos convencionales. Además, puede obtenerse scFv mediante expresión de los ADN que codifican scFv cultivando las células recombinantes resultantes. 30

El orden de VH y VL que van a enlazarse no está particularmente limitado, y pueden disponerse en cualquier orden. Ejemplos de la disposición se enumeran a continuación.

35 [VH] conector [VL]

[VL] conector [VH]

sc(Fv)<sub>2</sub> es un minicuerpo monocatenario producido ligando dos VH y dos VL usando conectores y semejantes (Hudson et al., 1999, J Immunol. Methods 231:177-189). sc(Fv)<sub>2</sub> puede producirse, por ejemplo, ligando scFv usando un conector.

Preferentemente, las dos VH y dos VL de un anticuerpo están dispuestas en el orden de VH, VL, VH y VL ([VH] conector [VL] conector [VH] conector [VL]) desde el extremo N del polipéptido monocatenario; sin embargo, el orden de las dos VH y dos VL no se limita a la disposición anterior, y pueden disponerse en cualquier orden. Ejemplos de la disposición se enumeran a continuación:

[VL] conector [VH] conector [VH] conector [VL]

[VH] conector [VL] conector [VL] conector [VH]

45 [VH] conector [VH] conector [VL] conector [VL]

[VL] conector [VL] conector [VH] conector [VH]

[VL] conector [VH] conector [VL] conector [VH]

La secuencia de aminoácidos de VH o VL del minicuerpo puede contener sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Además, en tanto que VH y VL tengan actividad de unión al antígeno cuando se ensamblan, puede

delecionarse una porción o pueden añadirse otros polipéptidos. Además, las regiones variables pueden quimerizarse o humanizarse.

5 En la divulgación, conectores que pueden usarse para ligar la región variable del anticuerpos incluyen conectores peptídicos arbitrarios que pueden introducirse por ingeniería genética, y conectores sintéticos, por ejemplo, los conectores desvelados en Protein Engineering, (1996) 9(3), 299-305.

Los conectores preferidos en la divulgación son conectores peptídicos. La longitud de los conectores peptídicos no está particularmente limitada y aquellos expertos en la materia pueden seleccionar apropiadamente la longitud según el fin. La longitud típica es uno a 100 aminoácidos, preferentemente 3 a 50 aminoácidos, más preferentemente 5 a 30 aminoácidos, y particularmente preferentemente 12 a 18 aminoácidos (por ejemplo, 15 aminoácidos).

10 Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos para conectores peptídicos incluyen las siguientes secuencias:

**Ser**

**Gly·Ser**

**Gly·Gly·Ser**

**Ser·Gly·Gly**

**Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 45)**

**Ser·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 46)**

**Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 47)**

**Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 48)**

**Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 49)**

**Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 50)**

**Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 51)**

**Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 52)**

**(Gly·Gly·Gly·Gly·Ser [SEQ ID NO: 47])<sub>n</sub>**

**(Ser·Gly·Gly·Gly·Gly [SEQ ID NO: 48])<sub>n</sub>**

en las que n es un número entero de 1 o más.

15 Las secuencias de aminoácidos de conectores peptídicos pueden seleccionarse apropiadamente por aquellos expertos en la materia según el fin. Por ejemplo, el "n" anterior que determina la longitud del conector peptídico normalmente es uno a cinco, preferentemente uno a tres, y más preferentemente uno o dos.

20 Conectores sintéticos (agentes de reticulación químicos) incluyen agentes de reticulación rutinariamente usados para reticular péptidos, por ejemplo, *N*-hidroxisuccinimida (NHS), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3), ditiobis(succinimidil propionato) (DSP), ditiobis(sulfosuccinimidil propionato) (DTSSP), bis(succinimidil succinato) de etilenglicol (EGS), bis(sulfosuccinimidil succinato) de etilenglicol (sulfo-EGS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis[2-(succinimidooxicarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES) y bis[2-(sulfosuccinimidooxicarbonilo)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de reticulación están comercialmente disponibles.

En general, se requieren tres conectores para ligar cuatro regiones variables del anticuerpo. Estos múltiples conectores pueden ser conectores iguales o diferentes.

25 Los anticuerpos descritos en el presente documento también incluyen anticuerpos en los que uno o más residuos de aminoácidos se han añadido a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo descrito en el presente documento.

30 Además, los anticuerpos descritos en el presente documento también incluyen proteínas de fusión en las que un anticuerpo anteriormente descrito está fusionado con otro péptido o proteína. La proteína de fusión puede prepararse ligando un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento y un polinucleótido que codifica otro péptido o polipéptido en marco, introduciendo éste en un vector de expresión, y expresando éste en un huésped. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. El péptido o polipéptido que va fusionarse con un anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un péptido conocido, por ejemplo, FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology 6, 1204-1210 (1988)), 6x His que consiste en seis residuos de His (histidina), 10x His, hemaglutinina de la

gripe (HA), fragmento de c-myc humano, fragmento VSV-GP, fragmento p18HIV, marca T7, marca HSV, marca E, fragmento del antígeno T del SV40, marca Ick, fragmento de  $\alpha$ -tubulina, marca B y fragmento de proteína C. Los polipéptidos que van a fusionarse con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, GST (glutatión-S-transferasa), HA (hemaglutinina de la gripe), región constante de inmunoglobulina,  $\beta$ -galactosidasa y MBP (proteína de unión a maltosa). Polinucleótidos comercialmente disponibles que codifican estos péptidos o polipéptidos pueden fusionarse con un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento. Un polipéptido de fusión puede prepararse expresando el polinucleótido de fusión así preparado.

Además, los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden conjugarse con anticuerpos ligados a diversas moléculas tales como polímeros, que incluyen polietilenglicol (PEG) y ácido hialurónico; sustancias radiactivas; sustancias fluorescentes; sustancias luminiscentes; enzimas; y toxinas. Tales anticuerpos conjugados pueden obtenerse modificando químicamente los anticuerpos obtenidos. Métodos para la modificación de anticuerpos ya se han establecido en la materia (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.057.313 y US 5.156.840). Los "anticuerpos" descritos en el presente documento también incluyen tales anticuerpos conjugados.

Además, los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos con cadenas de azúcar alteradas.

Además, los anticuerpos usados en la divulgación pueden ser anticuerpos biespecíficos. Anticuerpo biespecífico se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables que reconocen diferentes epítomos en la misma molécula de anticuerpo. Un anticuerpo biespecífico descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo biespecífico que reconoce diferentes epítomos sobre la molécula del receptor de IL-6, o un anticuerpo biespecífico en el que uno de los sitios de unión al antígeno reconoce el receptor de IL-6 y el otro sitio de unión al antígeno reconoce otra sustancia. Ejemplos de antígenos que se unen al otro sitio de unión al antígeno de un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo que reconoce el receptor de IL-6 descrito en el presente documento incluyen IL-6, TNF $\alpha$ , TNFR1, TNFR2, CD80, CD86, CD28, CD20, CD19, IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-1R, RANKL, RANK, IL-17, IL-17R, IL-23, IL-23R, IL-15, IL-15R, BlyS, linfotóxina  $\alpha$ , linfotóxina  $\beta$ , ligando LIGHT, LIGHT, VL-4, CD25, IL-12, IL-12R, CD40, CD40L, BAFF, CD52, CD22, IL-32, IL-21, IL-21R, GM-CSF, GM-CSFR, M-CSF, M-CSFR, IFN-alfa, VEGF, VEGFR, EGF, EGFR, CCR5, APRIL y APRILR.

Se conocen métodos para producir anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse, por ejemplo, ligando dos tipos de anticuerpos que reconocen antígenos diferentes. Los anticuerpos que van a ligarse pueden ser media molécula que contiene cada una una cadena H y una cadena L, o un cuarto de molécula que contiene solo una cadena H. Alternativamente, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos productores de células de fusión fusionando hibridomas que producen diferentes anticuerpos monoclonales. Además, pueden producirse anticuerpos biespecíficos por técnicas de ingeniería genética.

Como se describe más adelante, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden diferenciarse en la secuencia de aminoácidos, peso molecular, punto isoelectrico, presencia/ausencia de cadenas de azúcar y conformación, dependiendo del método de purificación, o la célula o huésped usado para producir los anticuerpos. Sin embargo, en tanto que el anticuerpo obtenido sea funcionalmente equivalente a un anticuerpo descrito en el presente documento, se incluye en la divulgación. Por ejemplo, cuando un anticuerpo descrito en el presente documento se expresa en células procariontas, por ejemplo, *Escherichia coli*, un residuo de metionina se añade al extremo N de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original. Tales anticuerpos también están incluidos en los anticuerpos descritos en el presente documento.

Pueden producirse polipéptidos de anticuerpos anti-receptor de IL-6 y semejantes descritos en el presente documento por métodos conocidos para aquellos expertos en la materia.

Un anticuerpo anti-receptor de IL-6 puede prepararse, por ejemplo, por técnicas de recombinación genética conocidas para aquellos expertos en la materia basándose en la secuencia del anticuerpo anti-receptor de IL-6 obtenido. Específicamente, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 puede prepararse construyendo un polinucleótido que codifica el anticuerpo basándose en la secuencia de un anticuerpo que reconoce el receptor de IL-6, insertando el polinucleótido en un vector de expresión y luego expresándolo en una célula huésped apropiada (véase por ejemplo, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178,476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121,663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

Así, la divulgación proporciona métodos de producción de (i) un polipéptido descrito en el presente documento, o (ii) un polipéptido codificado por un gen que codifica el polipéptido descrito en el presente documento, en el que los métodos comprenden la etapa de cultivar una célula huésped que comprende un vector en el que se introduce un polinucleótido que codifica el polipéptido descrito en el presente documento.

Más específicamente, la divulgación proporciona métodos de producción de un polipéptido descrito en el presente documento, que comprenden las etapas de:

- (a) cultivar una célula huésped que comprende un vector en el que se introduce un gen que codifica el

polipéptido descrito en el presente documento; y

(b) obtener el polipéptido codificado por el gen.

Ejemplos del vector incluyen vectores tipo M13, vectores tipo pUC, pBR322, pBluescript y pCR-Script. Alternativamente, cuando el objetivo es subclonar y escindir el ADNc, otros ejemplos de vector, además de los descritos anteriormente, incluyen pGEM-T, pDIRECT y pT7. Los vectores de expresión son particularmente útiles para producir anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, cuando el vector de expresión se usa para la expresión en *E. coli*, el vector debe tener características que permitan su amplificación en *E. coli*. Además, cuando el huésped es *E. coli* tal como JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 o XL1-Blue, es esencial que el vector lleve un promotor que permite su expresión eficiente en *E. coli*, por ejemplo, promotor lacZ (Ward et al., Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), promotor araB (Mejor et al., Science (1988) 240,1041-1043), promotor T7 o semejante. Tal vector incluye pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Quiagen), pEGFP y pET (en este caso, el huésped es preferentemente BL21 que expresa ARN polimerasa T7), además de los descritos anteriormente.

Además, los vectores de plásmidos de expresión pueden contener secuencias señal para la secreción de anticuerpo. Como secuencia señal para la secreción de anticuerpos, la secuencia señal pelB (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169,4379) puede usarse para la producción en el periplasma de *E. coli*. Los vectores pueden introducirse en células huésped, por ejemplo, por métodos con cloruro de calcio o electroporación.

Además de vectores para *E. coli*, vectores para producir anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, vectores de expresión derivados de mamífero (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEF-BOS (Nucleic Acids Res. (1990) 18(17), p5322), pEF y pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insecto (por ejemplo, el "sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC" (Gibco-BRL) y pBacPAKB), vectores de expresión derivados de planta (por ejemplo, pMH1 y pMH2), vectores de expresión derivados de virus animales (por ejemplo, pHSV, pMV y pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (por ejemplo, pZIPneo), vectores de expresión derivados de levadura (por ejemplo, "kit de expresión de *Pichia*" (Invitrogen), pNV11 y SP-Q01) y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608 y pKTH50).

Cuando el vector de plásmido de expresión se usa para la expresión en células de animales tales como células CHO, COS y NIH3T3, debe tener un promotor necesario para la expresión en aquellas células, por ejemplo, promotor del SV40 (Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108), promotor de MMLV-LTR, promotor de EF1 $\alpha$  (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18,5322) o promotor del CMV. Es incluso más preferible si el vector tiene un gen para la selección de células transformadas (por ejemplo, un gen de resistencia a fármaco que permite la distinción por un agente (neomicina, G418 o semejante). Vectores con tales características incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pHK-CMV, pOPRSV y pOP 13.

Además, cuando el objetivo es expresar establemente genes y amplificar un número de copias de genes en las células, puede usarse un método en el que células CHO deficientes en una vía de síntesis de ácido nucleico se introducen con un vector que tiene un gen DHFR que compensa la deficiencia (por ejemplo, pSV2-dhfr ("Molecular Cloning 2nd edition" Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))) y el vector se amplifica usando metotrexato (MTX). Además, cuando el objetivo es expresión génica transitoria, puede usarse un método en el que células COS que llevan un gen que expresa el antígeno T del SV40 sobre su cromosoma se transforman con un vector que lleva un origen de replicación del SV40 (pcD y semejante). Es posible usar orígenes de replicación derivados del virus del polioma, adenovirus, virus del papiloma bovino (VPV) y semejante. Además, para amplificar el número de copias del gen en líneas de células huésped, los vectores de expresión pueden comprender el gen aminoglucósido transferasa (APH), gen timidina cinasa (TK), gen xantina-guanina fosforribosiltransferasa de *E. coli* (Ecogpt), gen dihidrofolato reductasa (dhfr) y semejantes como marcador de selección.

Los anticuerpos resultantes descritos en el presente documento pueden aislarse de células huésped o de fuera de las células (el medio, o semejante), y purificarse como anticuerpos sustancialmente puros y homogéneos. Los anticuerpos pueden separarse y purificarse usando métodos de separación y de purificación convencionales para la purificación de anticuerpos, sin limitarse a éstos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden separarse y purificarse seleccionando y combinando apropiadamente cromatografía en columna, infiltración, ultrafiltración, precipitación por sales, precipitación con disolventes, extracción con disolventes, destilación, inmunoprecipitación, SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización y semejantes.

La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías pueden llevarse a cabo usando cromatografía en fase líquida, por ejemplo, HPLC y FPLC. Columnas usadas para la cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Ejemplos de columnas usando proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose FF (GE Amersham Biosciences). La divulgación también incluye anticuerpos altamente purificados usando tales métodos de purificación.

La actividad de unión del receptor de IL-6 de los anticuerpos obtenidos puede medirse por métodos conocidos para aquellos expertos en la materia. Métodos para medir la actividad de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen, por ejemplo, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), enzoinmunoanálisis (EIA), radioinmunoensayo (RIA) y métodos con anticuerpos fluorescentes. Por ejemplo, cuando se usa enzoinmunoanálisis, muestras que contienen anticuerpo tales como anticuerpos purificados y sobrenadantes de cultivo de células productoras de anticuerpo se añaden a placas recubiertas de antígeno. Se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima tal como fosfatasa alcalina, y las placas se incuban. Después de lavar, se añade un sustrato de enzima tal como fosfato de p-nitrofenilo, y la absorbancia se mide para evaluar la actividad de unión al antígeno.

#### Composiciones farmacéuticas

La divulgación también describe composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido como se describe en el presente documento como principio activo. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse en un método para tratar enfermedades asociadas a IL-6 tales como artritis reumatoide. Así, la divulgación también describe agentes para su uso en un método para tratar enfermedades tales como artritis reumatoide, que comprende un anticuerpo descrito anteriormente como principio activo. Ejemplos preferidos de enfermedades objetivo en la divulgación incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis idiopática juvenil sistémica, enfermedad de Castleman, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, enfermedad de Crohn, linfoma, colitis ulcerosa, anemia, vasculitis, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Still, amiloidosis, esclerosis múltiple, trasplante, degeneración macular senil, espondilitis anquilosante, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), nefropatía por IgA, osteoartritis, asma, nefropatía diabética, EICH, endometriosis, hepatitis (NASH), infarto de miocardio, arteriosclerosis, septicemia, osteoporosis, diabetes, mieloma múltiple, cáncer de próstata, cáncer de riñón, linfoma no Hodgkin de linfocitos B, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de colon, caquexia por cáncer, neuroinvasión por cáncer, infarto de miocardio, neovascularización coroidea miópica, neovascularización coroidea idiopática, uveítis, tiroiditis crónica, hipersensibilidad retardada, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, mesotelioma, polimiositis, dermatomiositis, panuveítis, uveítis anterior, uveítis intermedia, escleritis, queratitis, inflamación orbital, neuritis óptica, retinopatía diabética, vitreoretinopatía proliferativa, ojo seco e inflamación posoperatoria.

La expresión "para comprender un anticuerpo anti-receptor de IL-6 como principio activo" significa que comprende un anticuerpo anti-receptor de IL-6 como al menos uno de los principios activos, sin limitación particular en su contenido. Además, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden contener otros principios activos en combinación con los polipéptidos descritos anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse no solo para fines terapéuticos, sino también para fines preventivos.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden formularse según métodos convencionales (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, última edición, Mark Publishing Company, Easton, EE.UU.). Si se necesita, pueden contener vehículos y/o aditivos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, pueden incluir detergentes (por ejemplo, PEG y Tween), excipientes, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico), agentes colorantes, aromatizantes, conservantes, estabilizadores, agentes de tamponamiento (por ejemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico y otros ácidos orgánicos), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), agentes de suspensión, agentes isotonzantes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, promotores de la fluidez y correctores. Sin embargo, los agentes descritos en el presente documento para su uso en un método para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias no se limitan a lo anterior y pueden contener apropiadamente otros vehículos convencionales. Específicamente, ejemplos incluyen ácido silícico anhidro ligero, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, carmelosa cálcica, carmelosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, dietilaminoacetato de polivinilacetato, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicérido de ácido graso de cadena media, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 60, sacarosa, carboximetilcelulosa, almidón de maíz y sales inorgánicas. También pueden contener otros polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas tales como albúmina de suero, gelatina e inmunoglobulina; y aminoácidos. Cuando se preparan disoluciones acuosas para su uso en inyección, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 se disuelven, por ejemplo, en disoluciones isotónicas que contienen solución salina fisiológica, glucosa, u otros adyuvantes. Los adyuvantes incluyen, por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico. Además, pueden combinarse agentes solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcohol (etanol y similares), polialcohol (propilenglicol, PEG y similares) y tensioactivos no iónicos (polisorbato 80 y HCO-50).

Si fuera necesario, los polipéptidos pueden encapsularse en microcápsulas (microcápsulas hechas de hidroxilcelulosa, gelatina, poli(metacrilato de metilo) y similares), o hechas en un sistema de administración de fármacos coloidales (liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas, etc.) (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Science 16ª edición", Oslo Ed. (1980)). Además, se conocen métodos para preparar agentes como agentes de liberación sostenida, y éstos pueden aplicarse a los polipéptidos (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12: 98-105; patente de EE.UU. nº 3.773.919; solicitud de patente europea (EP) nº 58.481; Sidman et al., Biopolymers (1983) 22:547-56; documento EP nº 133.988). Además, el

volumen líquido para su uso en la administración subcutánea puede aumentarse añadiendo o mezclando hialuronidasa con un agente (por ejemplo, véase el documento WO 2004/078140).

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse tanto por vía oral como parenteralmente, pero preferentemente se administran parenteralmente. Específicamente, las composiciones van a administrarse a pacientes mediante inyección o transdérmicamente. Las inyecciones incluyen, por ejemplo, administraciones sistémicas y locales por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea, o semejantes. Las composiciones pueden inyectarse localmente en el sitio de tratamiento o en la periferia del sitio por inyección intramuscular, en particular. Formas de dosificación transdérmica incluyen, por ejemplo, pomadas, gel, crema, cataplasmas y parches, que pueden administrarse localmente o sistémicamente. Además, pueden seleccionarse apropiadamente métodos de administración según la edad del paciente y síntomas. La dosis administrada puede seleccionarse, por ejemplo, del intervalo de 0,0001 mg a 100 mg de principio activo por kg de peso corporal para cada administración. Alternativamente, cuando las composiciones van a administrarse a pacientes humanos, por ejemplo, el principio activo puede seleccionarse del intervalo de 0,001 a 1000 mg por kg de peso corporal para cada paciente. Una dosis de administración individual contiene preferentemente, por ejemplo, un anticuerpo desvelado en el presente documento a aproximadamente 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal

Los aminoácidos contenidos en las secuencias de aminoácidos en la divulgación pueden modificarse post-traduccionalmente (por ejemplo, la modificación de una glutamina del extremo N en un ácido piroglutámico por piroglutamilación es muy conocida para aquellos expertos en la materia). Naturalmente, tales aminoácidos post-traduccionalmente modificados están incluidos en las secuencias de aminoácidos en la divulgación.

Además, cadenas de azúcar que están unidas a los anticuerpos según la divulgación puede ser de cualquier estructura. Una cadena de azúcar en la posición 297 (numeración de EU) puede ser de cualquier estructura de cadena de azúcar (preferentemente una cadena de azúcar fucosilada), o puede no unirse a una cadena de azúcar (por ejemplo, esto puede lograrse produciendo anticuerpos en *Escherichia coli* o introduciendo alteración de manera que no se una una cadena de azúcar en la posición 297, numeración de EU).

## 25 Ejemplos

En el presente documento se describirá a continuación la divulgación específicamente con referencia a los ejemplos.

[Ejemplo 1] Identificación de sitios de mutación en las regiones variables para potenciar la afinidad de TOCILIZUMAB por el receptor de IL-6

Se construyó una biblioteca de secuencias de CDR en la que se han introducido mutaciones y se ensayó para mejorar la afinidad de TOCILIZUMAB (WT-IgG1 de cadena H/SEQ ID NO: 53; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54) por el receptor de IL-6. El cribado de una biblioteca de mutaciones de CDR reveló mutaciones que mejoran la afinidad por el receptor de IL-6. Las mutaciones se muestran en la Fig. 1. Una combinación de estas mutaciones dio TOCILIZUMAB de alta afinidad tal como RDC-23 (RDC23H-IgG1 de cadena H/SEQ ID NO: 55; RDC-23L-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 56). Se compararon la afinidad por el receptor de IL-6 soluble y la actividad biológica determinada usando BaF/gp130 entre RDC-23 y TOCILIZUMAB (véanse los Ejemplos de referencia para el método).

El resultado de la medición de afinidad se muestra en la Tabla 1. El resultado de la determinación de la actividad biológica usando BaF/gp130 (la concentración final de IL-6 fue 30 ng/ml) se muestra en la Fig. 2. Los resultados mostraron que la afinidad de RDC-23 fue aproximadamente 60 veces mayor, y la actividad expresada como concentración para el 100 % de inhibición de BaF/gp130 fue aproximadamente 100 veces mayor cuando se comparó con TOCILIZUMAB.

40 Tabla 1

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMAB	4,9E+05	2,0E-03	4,0E-09
RDC-23	6,4E+05	4,3E-05	6,7E-11

[Ejemplo 2] Identificación de mutaciones para mejorar la farmacocinética de TOCILIZUMAB mediante la reducción de su punto isoeléctrico

Para mejorar la farmacocinética de TOCILIZUMAB, se llevó a cabo investigación para identificar sitios de mutación que disminuirían el punto isoeléctrico de las regiones variables sin reducir significativamente la unión al receptor de IL-6. El cribado de sitios de mutación en las regiones variables, que se predijeron basándose en un modelo de estructura tridimensional de TOCILIZUMAB, reveló sitios de mutación que disminuirían el punto isoeléctrico de las regiones variables

5 sin reducir significativamente su unión al receptor de IL-6. Éstos se muestran en la Fig. 3. Una combinación de estas mutaciones dio TOCILIZUMAB con punto isoelectrico reducido que incluye, por ejemplo, H53/L28 (H53-IgG1 de cadena H/SEQ ID NO: 57; L28-kappa de cadena L /SEQ ID NO: 58). La afinidad por el receptor de IL-6 soluble, punto isoelectrico, farmacocinética en ratones y actividad biológica determinados usando BaF/gp130 se compararon entre H53/L28 y TOCILIZUMAB (véanse los Ejemplos de referencia para el método).

10 El resultado de la medición de afinidad se muestra en la Tabla 2. El resultado de la medición para la actividad biológica obtenida usando BaF/gp130 (la concentración final de IL-6 fue 30 ng/ml) se muestra en la Fig. 4. Los resultados mostraron que la afinidad de H53/L28 fue aproximadamente seis veces mayor y la actividad expresada como concentración para el 100 % de inhibición de BaF/gp130 fue aproximadamente varias veces mayor cuando se comparó con TOCILIZUMAB.

Tabla 2

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMAB	4,9E+05	2,0E-03	4,0E-09
H53/L28	7,6E+05	5,2E-04	6,8E-10

15 El resultado de la determinación del punto isoelectrico por electroforesis del punto isoelectrico conocida para aquellos expertos en la materia mostró que los puntos isoelectricos de TOCILIZUMAB y H53/L28 fueron aproximadamente 9,3 y 6,5 a 6,7, respectivamente. Así, el punto isoelectrico de H53/L28 se redujo aproximadamente 2,7 cuando se comparó con TOCILIZUMAB. Además, el punto isoelectrico teórico de las regiones variables VH/VL se calculó usando GENETYX (GENETYX CORPORATION). El resultado mostró que los puntos isoelectricos teóricos de TOCILIZUMAB y H53/L28 fueron 9,20 y 4,52, respectivamente. Así, el punto isoelectrico de H53/L28 se redujo aproximadamente 4,7 cuando se comparó con TOCILIZUMAB.

20 Para evaluar la farmacocinética del anticuerpo H53/L28 alterado que tiene un punto isoelectrico reducido, se compararon la farmacocinética de TOCILIZUMAB y H53/L28 en ratones normales. Una dosis única de TOCILIZUMAB o H53/L28 se administró intravenosamente (IV) o subcutáneamente (SC) a 1 mg/kg a ratones (C57BL/6J; Charles River Japan, Inc.) para evaluar el transcurso de tiempo de la concentración plasmática. Los transcurros de tiempo de la concentración plasmática para TOCILIZUMAB y H53/L28 después de la administración intravenosa o la administración subcutánea se muestran en las Fig. 5 y 6, respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos (eliminación (CL) y semivida (T1/2)) obtenidos usando WinNonlin (Pharsight) se muestran en la Tabla 3. La semivida en plasma (T1/2) de H53/L28 después de la administración intravenosa se prolongó a aproximadamente 1,3 veces la de TOCILIZUMAB, mientras que la eliminación se redujo aproximadamente 1,7 veces. T1/2 de H53/L28 después de la administración subcutánea aumentó a aproximadamente dos veces la de TOCILIZUMAB, mientras que la eliminación se redujo aproximadamente 2,1 veces. Así, se encontró que la farmacocinética podría mejorarse significativamente reduciendo el punto isoelectrico de TOCILIZUMAB mediante la sustitución de aminoácidos.

Tabla 3

	IV		SC	
	CL ml/h/kg	T1/2 día	CL/F ml/h/kg	T1/2 día
TOCILIZUMAB	0,177	18,5	0,18	14,7
H53/L28	0,102	23,5	0,086	29,7

[Ejemplo 3] Identificación de sitios de mutación que reducen la inmunogenia de TOCILIZUMAB

35 Identificación de mutaciones que reducen el riesgo de inmunogenia de epítomos de linfocitos T presentes en las regiones variables

40 Se analizaron epítomos de linfocitos T presentes en la secuencia de la región variable de TOCILIZUMAB usando TEPITOPE (Methods. 2004 Dec; 34(4):468-75). Como resultado, se predijo que CDR2 de la cadena L tenía muchos epítomos de linfocitos T que se unirían a HLA (es decir, para tener una secuencia con un alto riesgo de inmunogenia riesgo). Así, se llevó a cabo el análisis TEPITOPE para examinar sustituciones de aminoácidos que reducirían el riesgo de inmunogenia de CDR2 de la cadena L sin disminuir la estabilidad, actividad de unión o actividad neutralizante.

Como se describe más adelante, el resultado del cribado demostró que el riesgo de inmunogenia puede reducirse sin disminuir la estabilidad, actividad de unión o actividad neutralizante sustituyendo la treonina en L51 (numeración de Kabat; Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)) de CDR2 de la cadena L (SEQ ID NO: 59) de TOCILIZUMAB con glicina, y la arginina en L53 con ácido glutámico (SEQ ID NO: 60).

5 CDR2 de la cadena L de TOCILIZUMAB (SEQ ID NO: 59)

CDR2 de la cadena L de TOCILIZUMAB con epítomos de linfocitos T eliminados (SEQ ID NO: 60)

[Ejemplo 4] Reducción del riesgo de inmunogenia por humanización completa de las secuencias de la región estructural de la región variable de TOCILIZUMAB

10 En el proceso de humanización de TOCILIZUMAB, algunas secuencias de ratón quedan en la secuencia de la región estructural para mantener la actividad de unión (Cancer Res. 1993 Feb 15; 53(4):851-6). Estas secuencias son H27, H28, H29 y H30 en FR1 de la cadena H y H71 en FR3 de la cadena H (numeración de Kabat; Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)) de la secuencia de la región variable de TOCILIZUMAB. Las secuencias de ratón que quedaron son una posible causa de elevado riesgo de inmunogenia. Así, se evaluó si la secuencia de la región estructural podría humanizarse completamente para reducir adicionalmente el riesgo de  
15 inmunogenia de TOCILIZUMAB.

El resultado mostró que la región estructural entera de TOCILIZUMAB podría estar completamente humanizada sin disminuir la estabilidad, actividad de unión o actividad neutralizante, sustituyendo FR1 de la cadena H (SEQ ID NO: 61) de TOCILIZUMAB con FR1-A de la cadena H humanizado (SEQ ID NO: 62) mostrada a continuación, y sustituyendo FR3 de la cadena H (SEQ ID NO: 63) con FR3 de la cadena H humanizada (SEQ ID NO: 64) mostrada a continuación.

20 FR1 de la cadena H de TOCILIZUMAB (SEQ ID NO: 61)

FR1-A de la cadena H humanizada (SEQ ID NO: 62) (derivada de la línea germinal IMGT hVH\_4)

FR3 de la cadena H de TOCILIZUMAB (SEQ ID NO: 63)

FR3 de la cadena H humanizada (SEQ ID NO: 64) (derivada de Mol. Immunol. 2007, 44(4):412-422)

25 [Ejemplo 5] Identificación de sitios de mutación para mejorar la farmacocinética basándose en la unión dependiente del pH de TOCILIZUMAB al receptor de IL-6

Uno de los métodos para mejorar la farmacocinética de TOCILIZUMAB es mejorar la molécula de forma que una única molécula de TOCILIZUMAB se uniría repetidamente y neutralizaría varias moléculas del receptor de IL-6. Se supone que después de la unión al receptor de IL-6 de tipo membrana, TOCILIZUMAB se recoge en endosomas intracelulares mediante internalización mientras que se une al receptor de IL-6 de tipo membrana, luego se transfiere a lisosomas mientras que se une al receptor de IL-6 de tipo membrana, y se degrada por lisosomas. Específicamente, una molécula de TOCILIZUMAB normalmente se une a una o dos moléculas del receptor de IL-6 de tipo membrana (en una forma monovalente o divalente) y se degrada en lisosomas después de la internalización. Por tanto, una molécula de TOCILIZUMAB puede sola unirse a y neutralizar una o dos moléculas de receptor de IL-6 de tipo membrana.

35 Así, si era posible crear TOCILIZUMAB que se uniera de una manera dependiente del pH, en el que la unión de TOCILIZUMAB se mantiene bajo condiciones neutras pero significativamente reducidas en condiciones ácidas, TOCILIZUMAB que se une de una manera dependiente del pH podría disociarse del receptor de IL-6 de tipo membrana (antígeno) en los endosomas y volver al plasma uniéndose a FcRn presente en los endosomas, como se ilustra en la Fig. 7. Una vez devuelto al plasma, TOCILIZUMAB que se une de una manera dependiente del pH podría de nuevo unirse al receptor de IL-6 de tipo membrana. Repitiendo esta unión en el plasma y disociación en los endosomas, se cree que una molécula de TOCILIZUMAB puede unirse/neutralizar repetidamente varias moléculas del receptor de IL-6. Así, TOCILIZUMAB que se une de una manera dependiente del pH se supone que tiene farmacocinética mejorada en comparación con TOCILIZUMAB.

45 Para que TOCILIZUMAB se disocie del receptor de IL-6 bajo la condición ácida en el endosoma, la unión debe estar significativamente debilitada bajo la condición ácida en comparación con bajo la condición neutra. Sobre la superficie celular, se requiere la fuerte unión del receptor de IL-6 para la neutralización; por tanto, a pH 7,4 que es el pH de la superficie celular, el anticuerpo debe unirse al receptor de IL-6 tan fuertemente como o más fuertemente que TOCILIZUMAB. Se ha informado que el pH endosómico es generalmente 5,5 a 6,0 (Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Feb;5(2):121-32). Así, si TOCILIZUMAB que se une de una manera dependiente del pH se modifica para unirse débilmente al receptor de IL-6 a pH 5,5 a 6,0, puede predecirse que se disociará del receptor de IL-6 bajo la condición  
50 ácida en los endosomas. Específicamente, si TOCILIZUMAB que se une de una manera dependiente del pH mejora para unirse fuertemente al receptor de IL-6 a pH 7,4, que es el pH de la superficie celular, y para unirse débilmente al receptor de IL-6 a pH 5,5 a 6,0, que es el pH endosómico, una molécula de TOCILIZUMAB puede unirse y neutralizar varias

moléculas del receptor de IL-6, y la farmacocinética puede, por tanto, mejorarse.

Un posible método para conferir dependencia del pH a la unión de TOCILIZUMAB al receptor de IL-6 es introducir residuos de histidina en la región variable de TOCILIZUMAB, ya que la pKa de un residuo de histidina es aproximadamente 6,0 a 6,5 y su estado de disociación protónica cambia entre condiciones neutras (pH 7,4) y ácidas (pH 5,5 a 6,0). Así, se llevó a cabo el cribado para identificar sitios para la introducción de histidina en las regiones variables basándose en un modelo de estructura tridimensional de TOCILIZUMAB. Además, secuencias seleccionadas de la región variable de TOCILIZUMAB se sustituyeron aleatoriamente con histidina para diseñar una biblioteca para cribar. El cribado se llevó a cabo usando la unión al receptor de IL-6 a pH 7,4 y la disociación del receptor de IL-6, o la reducción de afinidad a pH 5,5 a 5,8 como índice.

Como resultado, se descubrieron sitios de mutación que confieren la unión de TOCILIZUMAB al receptor de IL-6 con dependencia del pH (la propiedad de unirse a pH 7,4 y disociarse a pH 5,8). Éstos se muestran en la Fig. 8. En la Fig. 8, la sustitución de tirosina en H27 a histidina es una mutación en FR1 de la cadena H, no en la CDR. Sin embargo, como se describe en Eur. J. Immunol. (1992) 22: 1719-1728, una secuencia con histidina en H27 es una secuencia humana (SEQ ID NO: 65). Así, el anticuerpo puede humanizarse completamente usando la siguiente región estructural en combinación con el Ejemplo 4.

FR1-B de la cadena H humanizada (SEQ ID NO: 65)

Una combinación de mutaciones que incluyen, por ejemplo, H3pl/L73 (cadena H, H3pl-IgG1/SEQ ID NO: 66; L73-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 67) pueden dar TOCILIZUMAB, con propiedades de unión dependientes del pH. Se compararon H3pl/L73 y TOCILIZUMAB para su afinidad hacia el receptor de IL-6 soluble a pH 7,4, tasa de disociación del receptor de IL-6 de tipo membrana a pH 7,4 y pH 5,8, actividad biológica usando BaF/gp130 y farmacocinética en mono cinomolgo y ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano (véanse los Ejemplos de referencia para el método).

El resultado del ensayo de afinidad por el receptor de IL-6 soluble a pH 7,4 se muestra en la Tabla 4. El resultado del ensayo para la actividad biológica obtenida usando BaF/gp130 (concentración de IL-6 final de 30 ng/ml) se muestra en la Fig. 9. Estos resultados mostraron que H3pl/L73 es comparable a TOCILIZUMAB en términos de afinidad por el receptor de IL-6 soluble a pH 7,4 y actividad en BaF/gp130.

Tabla 4

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMAB	5,1E+05	1,0E-03	2,1E-09
H3pl/L73	5,4E+05	7,4E-04	1,4E-09

El resultado de la medición para la tasa de disociación de TOCILIZUMAB o H3pl/L73 del receptor de IL-6 de tipo membrana a pH 7,4 y pH 5,8 se muestra en la Tabla 5. En comparación con TOCILIZUMAB, la constante de disociación de H3pl/L73 a pH 5,8 fue más rápida y la dependencia del pH de la tasa de disociación del receptor de IL-6 de tipo membrana aumentó aproximadamente 2,6 veces.

Tabla 5

	pH 7,4	pH 5,8	$k_{d(pH5,8)}/k_{d(pH7,4)}$
	$k_d$ (1/s)	$k_d$ (1/s)	DEPENDENCIA DEL pH
TOCILIZUMAB	2,5E-04	2,5E-04	1,00
H3pl/L73	2,6E-04	6,7E-04	2,59

Se administró intravenosamente una dosis única de TOCILIZUMAB o H3pl/L73 a 1 mg/kg a monos cinomolgos para evaluar el transcurso de tiempo de la concentración plasmática. Los transcurros de tiempo de la concentración plasmática de TOCILIZUMAB o H3pl/L73 después de la administración intravenosa se muestran en la Fig. 10. El resultado mostró que la farmacocinética de H3pl/L73 en monos cinomolgos mejoró significativamente en comparación con TOCILIZUMAB.

Se administró intravenosamente una dosis única de TOCILIZUMAB o H3pl/L73 a 25 mg/kg a ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano (ratones hIL-6R tg; Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 23; 92(11):4862-6) para evaluar el

transcurso de tiempo de la concentración plasmática. Los transcurros de tiempo de la concentración plasmática de TOCILIZUMAB o H3pl/L73 después de la administración intravenosa se muestran en la Fig. 11. El resultado mostró que la farmacocinética de H3pl/L73 en ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano mejoró significativamente en comparación con TOCILIZUMAB.

- 5 H3pl/L73, que es un TOCILIZUMAB con propiedades de unión dependientes del pH, mostró farmacocinética significativamente mejorada en monos cinomolgos y ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano cuando se comparó con TOCILIZUMAB. Esto sugiere que es posible unirse a y neutralizar varias moléculas del receptor de IL-6 con una única molécula, confiriendo la propiedad de unión al antígeno a pH 7,4 y disociándose del antígeno a pH 5,8. También se consideró que la farmacocinética podría mejorarse adicionalmente confiriendo unión del receptor de IL-6 con una dependencia del pH más pronunciada que la de H3pl/L73.

[Ejemplo 6] Optimización de la región constante de TOCILIZUMAB

#### Reducción de la heterogeneidad del extremo C de la cadena H de TOCILIZUMAB

15 Para la heterogeneidad de las secuencias del extremo C de la cadena H de un anticuerpo IgG, se ha informado de la delección del residuo de lisina de aminoácidos del extremo C, y amidación del grupo carboxilo del extremo C debido a la delección de los dos aminoácidos del extremo C, glicina y lisina (Anal Biochem. 2007 Jan 1; 360(1):75-83). También en TOCILIZUMAB, el principal componente es una secuencia en la que el aminoácido de lisina del extremo C en la secuencia de nucleótidos está deleccionado por modificación postraduccional; sin embargo, sub-componentes en los que la lisina sigue y sub-componentes en los que el grupo carboxilo del extremo C está amidado debido a delección de tanto la glicina como la lisina también existen como heterogeneidad. No es fácil y sería más costoso fabricarlos como producto a gran escala mientras que se mantiene la heterogeneidad relacionada de sustancias objetivo/sustancias relacionadas entre las producciones. Si es posible, se desea que sean sustancias únicas, y que tengan heterogeneidad reducida cuando se desarrollan anticuerpos como productos farmacéuticos. Así, es preferible que la heterogeneidad del extremo C de la cadena H esté ausente cuando se desarrollan anticuerpos como productos farmacéuticos.

25 Se alteró el aminoácido del extremo C para reducir la heterogeneidad de aminoácidos del extremo C. El resultado mostró que la heterogeneidad derivada del extremo C puede prevenirse pre-delecionando de la secuencia de nucleótidos los residuos de lisina y de glicina en el extremo C de la región constante de la cadena H de TOCILIZUMAB. TOCILIZUMAB, TOCILIZUMAB que carece del residuo de lisina del extremo C (TOCILIZUMAB $\Delta$ K: WT-IgG1 $\Delta$ K de cadena H/SEQ ID NO: 68; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54) y TOCILIZUMAB que carece de los residuos de lisina y de glicina del extremo C (TOCILIZUMAB $\Delta$ GK: WT-IgG1 $\Delta$ GK de cadena H/SEQ ID NO: 69; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54) se evaluaron para heterogeneidad por cromatografía de intercambio catiónico. Se usó la columna ProPac WCX-10, 4 x 250 mm (Dionex); y la fase móvil A fue 25 mmol/l de MES/NaOH (pH 6,1) y la fase móvil B fue 25 mmol/l de MES/NaOH, 250 mmol/l de NaCl (pH 6,1). Se usaron velocidad de flujo y gradiente apropiados. El resultado de la evaluación obtenido por cromatografía de intercambio catiónico se muestra en la Fig. 12. El resultado mostró que la heterogeneidad de aminoácidos del extremo C puede reducirse deleccionando previamente de la secuencia de nucleótidos tanto los residuos de lisina como de glicina en el extremo C de la región constante de la cadena H, pero no deleccionando previamente solo el residuo de lisina en el extremo C de la región constante de la cadena H. Todas las secuencias de la región constante del extremo C de los anticuerpos humanos IgG1, IgG2 y IgG4 contienen lisina y glicina en las posiciones 447 y 446, respectivamente, según la numeración de EU (véase Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242). Por tanto, se espera que el método para reducir la heterogeneidad de aminoácidos del extremo C encontrada en el estudio también se aplique a regiones constantes de IgG2 e IgG4 y variantes de las mismas.

#### Reducción de la heterogeneidad derivada del enlace disulfuro en TOCILIZUMAB de isotipo IgG2

45 El isotipo de TOCILIZUMAB es IgG1. Como TOCILIZUMAB es un anticuerpo neutralizante, la unión al receptor de Fc $\gamma$  puede ser desfavorable en vista de la inmunogenia y efectos adversos. Un posible método para reducir la unión al receptor de Fc $\gamma$  es convertir el isotipo del anticuerpo IgG de IgG1 a IgG2 o IgG4 (Ann Hematol. 1998 Jun; 76(6):231-48). Desde el punto de vista de la unión del receptor I de Fc $\gamma$  y la farmacocinética, se consideró que IgG2 era más deseable que IgG4 (Nat Biotechnol. 2007 Dec; 25(12):1369-72). Mientras tanto, las propiedades fisicoquímicas de proteínas, en particular, homogeneidad y estabilidad, son muy importantes cuando se desarrollan anticuerpos como productos farmacéuticos. Se ha informado que el isotipo IgG2 tiene heterogeneidad muy alta debido a los enlaces disulfuro en la región bisagra (J Biol Chem. 2008 Jun 6; 283(23):16206-15). No es fácil y sería más costoso fabricarlos como productos farmacéuticos a gran escala mientras que se mantiene la heterogeneidad relacionada con sustancias objetivo/sustancias relacionadas derivada de enlaces disulfuro entre producciones. Así, son deseables sustancias individuales en la medida de lo posible. Así, cuando se desarrollan anticuerpos de isotipo IgG2 en productos farmacéuticos, es preferible reducir la heterogeneidad derivada de los enlaces disulfuro sin reducir la estabilidad.

55 Con el fin de reducir la heterogeneidad del isotipo IgG2 se evaluaron diversas variantes. Como resultado, se encontró que la heterogeneidad podría reducirse sin disminuir la estabilidad usando la región constante de WT-SKSC (SEQ ID NO: 70),

en la que de las secuencias de la región constante de IgG2, el residuo de cisteína en la posición 131 y el residuo de arginina en la posición 133 (numeración de EU) en el dominio CH1 de la cadena H se sustituyeron con serina y lisina, respectivamente, y el residuo de cisteína en la posición 219 (numeración de EU) en la bisagra superior de la cadena H se sustituyó con serina. TOCILIZUMAB-IgG1 (WT-IgG1 de cadena H/SEQ ID NO: 53; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54), TOCILIZUMAB-IgG2 (WT-IgG2 de cadena H/SEQ ID NO: 71; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54) y TOCILIZUMAB-SKSC (WT-SKSC de cadena H/SEQ ID NO: 70; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54) se prepararon y se evaluaron para heterogeneidad y estabilidad. La heterogeneidad se evaluó por cromatografía de intercambio catiónico. Se usó la columna ProPac WCX-10 (Dionex); y la fase móvil A fue acetato sódico 20 mM (pH 5,0) y la fase móvil B fue acetato sódico 20 mM, NaCl 1 M (pH 5,0). Se usaron velocidad de flujo y gradiente apropiados. El resultado de la evaluación obtenido por cromatografía de intercambio catiónico se muestra en la Fig. 13. La estabilidad se evaluó basándose en la temperatura intermedia en la desnaturalización térmica (valor de Tm) determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (VP-DSC; Microcal). El resultado de la medición de DSC en acetato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 y el valor de Tm del dominio Fab se muestran en la Fig. 14.

El resultado mostró que la heterogeneidad aumentó sustancialmente en TOCILIZUMAB-IgG2 en comparación con TOCILIZUMAB-IgG1; sin embargo, la heterogeneidad podría reducirse significativamente por conversión a TOCILIZUMAB-SKSC. Además, cuando se comparó con TOCILIZUMAB-IgG1, la DSC de TOCILIZUMAB-IgG2 dio un componente de pico secundario (Fab\*) con baja estabilidad, es decir, baja Tm, en los picos de desnaturalización térmica del dominio Fab, que se supone que es debido a un componente heterogéneo. Sin embargo, cuando se convirtió a TOCILIZUMAB-SKSC, el pico secundario (baja Tm), que se cree que es debido a un componente heterogéneo, desapareció, y el valor de Tm fue aproximadamente 94 °C, que fue equivalente al del dominio de Fab de TOCILIZUMAB-IgG1 y TOCILIZUMAB-IgG2. Así, se reveló que TOCILIZUMAB-SKSC tenía alta estabilidad.

Identificación de sitios de mutación que mejoran la farmacocinética en la región constante de TOCILIZUMAB

Como se ha descrito anteriormente, a partir de IgG1, que es el isotipo de TOCILIZUMAB, puede lograrse la reducción de la heterogeneidad del extremo C y la reducción de la heterogeneidad de anticuerpos con regiones constantes de isotipo IgG2 mientras que se reduce la unión al receptor de Fcγ y se mantiene la alta estabilidad. Además, se prefiere que la región constante también tenga farmacocinética superior que IgG1, que es el isotipo de TOCILIZUMAB.

Con el fin de encontrar regiones constantes que tengan una semivida en plasma superior a la de los anticuerpos con regiones constantes de isotipo IgG1, se llevó a cabo cribado para identificar sitios de mutación para mejorar la farmacocinética de TOCILIZUMAB-SKSC que tiene alta estabilidad y reducida heterogeneidad relacionada con anticuerpos con regiones constantes de isotipo IgG2 como se ha mencionado anteriormente. Como resultado, se descubrió WT-M58 (SEQ ID NO: 72 (secuencia de aminoácidos)), en el que, en comparación con WT-SKSC, el ácido glutámico en la posición 137 (numeración de EU) está sustituido con glicina, la serina en la posición 138 está sustituida con glicina, la histidina en la posición 268 está sustituida con glutamina, la arginina en la posición 355 está sustituida con glutamina, la glutamina en la posición 419 está sustituida con ácido glutámico, y en el que la glicina en la posición 446 y la lisina en la posición 447 están deletionadas para reducir la heterogeneidad del extremo C de la cadena H. Además, WT-M44 (SEQ ID NO: 73 (secuencia de aminoácidos)) se preparó para tener sustitución de asparagina en la posición 434 a alanina, con respecto a IgG1. Además, WT-M83 (SEQ ID NO: 74 (secuencia de aminoácidos)) se produjo deletionando glicina en la posición 446 y lisina en la posición 447 de M44 para reducir la heterogeneidad del extremo C de la cadena H. Además, WT-M73 (SEQ ID NO: 75 (secuencia de aminoácidos)) se produjo sustituyendo asparagina en la posición 434 con alanina en WT-M58.

Se prepararon y evaluaron TOCILIZUMAB-M44 (WT-M44 de cadena H/SEQ ID NO: 73; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54), TOCILIZUMAB-M58 (WT-M58 de cadena H/SEQ ID NO: 72; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54) y TOCILIZUMAB-M73 (WT-M73 de cadena H/SEQ ID NO: 75; WT-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 54) para su afinidad hacia FcRn humano y farmacocinética usando ratones transgénicos para FcRn humano (véanse los Ejemplos de referencia para el método).

La unión de TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 y TOCILIZUMAB-M73 a FcRn humano se evaluó usando Biacore. Como se muestra en la Tabla 6, la unión de TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 y TOCILIZUMAB-M73 fue aproximadamente 2,7 veces, 1,4 veces y 3,8 veces superior a la de TOCILIZUMAB-IgG1, respectivamente.

Tabla 6

	KD (μM)
TOCILIZUMAB-IgG1	1,62

TOCILIZUMAB-M44	0,59
TOCILIZUMAB-M58	1,17
TOCILIZUMAB-M73	0,42

Se evaluaron TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 y TOCILIZUMAB-M73 para su farmacocinética en ratones transgénicos para FcRn humano. El resultado se muestra en la Fig. 15. Cuando se comparó con TOCILIZUMAB-IgG1, se encontró que todos de TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 y TOCILIZUMAB-M73 presentaban farmacocinética mejorada, como se muestra en la Fig. 15. El efecto de mejorar la farmacocinética se correlacionó con la capacidad para unirse a FcRn humano. En particular, la concentración de TOCILIZUMAB-M73 en plasma después de 28 días mejoró aproximadamente 16 veces en comparación con TOCILIZUMAB-IgG1. Así, también se supuso que anticuerpos que tienen la región constante de M73 tienen farmacocinética significativamente mejorada en seres humanos en comparación con anticuerpos que tienen la región constante de IgG1.

10 [Ejemplo 7] Preparación de anticuerpos para el receptor de IL-6 completamente humanizados con PK/PD mejorada

Se prepararon variantes de TOCILIZUMAB combinando múltiples mutaciones en las regiones variables y constantes de TOCILIZUMAB encontradas en los ejemplos anteriormente. Los anticuerpos para el receptor de IL-6 completamente humanizados descubiertos de diversos cribados fueron: Fv3-M73 (VH4-M73 de cadena H/SEQ ID NO: 25; VL1-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 28), Fv4-M73 (VH3-M73 de cadena H/SEQ ID NO: 26; VL3-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 29) y Fv5-M83 (VH5-M83 de cadena H/SEQ ID NO: 27; VL5-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 30).

Las afinidades de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 preparados contra el receptor de IL-6 se compararon con la de TOCILIZUMAB (véase el Ejemplo de referencia para el método). Las afinidades de estos anticuerpos por el receptor de IL-6 soluble determinadas a pH 7,4 se muestran en la Tabla 7. Además, sus actividades neutralizantes de BaF/gp130- se compararon con aquellas de TOCILIZUMAB y el control (el anticuerpo anti-receptor de IL-6 descrito de alta afinidad conocido descrito en el Ejemplo de referencia, y VQ8F11-21 hlgG1 descrito en el documento US 2007/0280945) (véase el Ejemplo de referencia para el método). Los resultados obtenidos determinando las actividades biológicas de estos anticuerpos usando BaF/gp130 se muestran en la Fig. 16 (TOCILIZUMAB, el control y Fv5-M83 con una concentración de IL-6 final de 300 ng/ml) y la Fig. 17 (TOCILIZUMAB, Fv3-M73 y Fv4-M73 con una concentración de IL-6 final de 30 ng/ml). Como se muestra en la Tabla 7, Fv3-M73 y Fv4-M73 tienen aproximadamente dos a tres veces mayor afinidad que TOCILIZUMAB, mientras que Fv5-M83 presenta aproximadamente 100 veces mayor afinidad que TOCILIZUMAB (como fue difícil de medir la afinidad de Fv5-M83, en su lugar se determinó la afinidad usando Fv5-IgG1 (VH5-IgG1 de cadena H/SEQ ID NO: 76; VL5-kappa de cadena L/SEQ ID NO: 30), que tiene una región constante de tipo IgG1; se cree generalmente que la región constante no tiene efecto sobre la afinidad). Como se muestra en la Fig. 17, Fv3-M73 y Fv4-M73 presentan actividades ligeramente más fuertes que TOCILIZUMAB. Como se muestra en la Fig. 16, Fv5-M83 tiene una actividad muy fuerte, que es superior a 100 veces superior a la de TOCILIZUMAB en términos de la concentración inhibitora al 50 %. Fv5-M83 también presenta aproximadamente 10 veces mayor actividad neutralizante en términos de concentración inhibitora al 50 % que el control (el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido).

Tabla 7

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMAB	4,0E+05	1,1E-03	2,7E-09
Fv3-M73	8,5E+05	8,7E-04	1,0E-09
Fv4-M73	7,5E+05	1,0E-03	1,4E-09
Fv5-M83	1,1E+06	2,8E-05	2,5E-11

35 Se determinaron las tasas de disociación de TOCILIZUMAB, Fv3-M73 y Fv4-M73 del receptor de IL-6 de tipo membrana a pH 7,4 y 5,8. Como se demuestra por el resultado mostrado en la Tabla 8 (véase el Ejemplo de referencia para el método), la dependencia del pH de la constante de disociación de Fv3-M73 y Fv4-M73 del receptor de IL-6 de tipo membrana mejoró aproximadamente 11 veces y 10 veces, respectivamente, en comparación con TOCILIZUMAB. La considerable mejora de la dependencia del pH de la constante de disociación con respecto a H3pl/L73 descrita en el Ejemplo 5 sugirió que cuando se compara con H3pl/L73, la farmacocinética de Fv3-M73 y Fv4-M73 mejoraría significativamente.

Tabla 8

	pH 7,4	pH 5,8	$K_d(pH5,8)/K_d(pH7,4)$
	$k_d$ (1/s)	$k_d$ (1/s)	DEPENDENCIA DEL pH
TOCILIZUMAB	2,5E-04	2,5E-04	1,00
Fv3-M73	4,9E-04	5,3E-03	10,88
Fv4-M73	5,1E-04	5,1E-03	10,06

Se determinaron los puntos isoeléctricos de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 por electroforesis por isoelectroenfoque usando un método conocido para aquellos expertos en la materia. El resultado mostró que el punto isoeléctrico era aproximadamente 9,3 para TOCILIZUMAB; aproximadamente 8,4 a 8,5 para el control; aproximadamente 5,7 a 5,8 para Fv3-M73; aproximadamente 5,6 a 5,7 para Fv4-M73; y 5,4 a 5,5 para Fv5-M83. Así, cada anticuerpo tuvo un punto isoeléctrico significativamente reducido cuando se comparó con TOCILIZUMAB y el control. Además, el punto isoeléctrico teórico de las regiones variables VH/VL se calculó por GENETYX (GENETYX CORPORATION). El resultado mostró que el punto isoeléctrico teórico era 9,20 para TOCILIZUMAB; 7,79 para el control; 5,49 para Fv3-M73; 5,01 para Fv4-M73; y 4,27 para Fv5-M83. Así, cada anticuerpo tuvo un punto isoeléctrico significativamente reducido cuando se comparó con TOCILIZUMAB y el control. Como se mostró en el Ejemplo 2 que la farmacocinética mejora reduciendo el punto isoeléctrico, se creyó que la farmacocinética de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 mejoró cuando se comparó con TOCILIZUMAB y el control.

Se analizaron epítomos de linfocitos T en la secuencia de la región variable de TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83 usando TEPITOPE (Methods. 2004 Dec;34(4):468-75). Como resultado, se predijo que TOCILIZUMAB tenía epítomos de linfocitos T, de los que muchos podrían unirse a HLA, como se muestra en el Ejemplo 3. A diferencia, el número de secuencias que se predijo que se unían a epítomos de linfocitos T fue significativamente reducido en Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83. Además, la región estructural de Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83 no tiene secuencia de ratón y así es completamente humanizada. Estos sugieren la posibilidad de que el riesgo de inmunogenia sea significativamente reducido en Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 cuando se compara con TOCILIZUMAB.

[Ejemplo 8] Prueba de PK/PD de anticuerpos para el receptor de IL-6 completamente humanizados en monos

Cada uno de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 se administró intravenosamente una vez a una dosis de 1 mg/kg a monos cinomolgos para evaluar su transcurso de tiempo de concentración plasmática (véase el Ejemplo de referencia para el método). Los transcurros de tiempo de la concentración plasmática de TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 después de la administración intravenosa se muestran en la Fig. 18. El resultado mostró que cada uno de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 presentó farmacocinética significativamente mejorada en monos cinomolgos cuando se compara con TOCILIZUMAB y el control. De ellos, Fv3-M73 y Fv4-M73 presentaron farmacocinética altamente mejorada cuando se compara con TOCILIZUMAB.

Se evaluó la eficacia de cada anticuerpo para neutralizar el receptor de IL-6 de mono cinomolgo de tipo membrana. Se administró subcutáneamente IL-6 de mono cinomolgo en la parte baja de la espalda a 5 µg/kg cada día desde el día 6 hasta el día 18 después de la administración del anticuerpo (día 3 a día 10 para TOCILIZUMAB), y la concentración de CRP en cada animal se determinó 24 horas después (véase el Ejemplo de referencia para el método). El transcurso de tiempo de la concentración de CRP después de la administración de cada anticuerpo se muestra en la Fig. 19. Para evaluar la eficacia de cada anticuerpo para neutralizar receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble, se determinó la concentración plasmática de receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble libre en los monos cinomolgos y se calcularon los porcentajes de receptor de IL-6 soluble libre (véase el Ejemplo de referencia para el método). El transcurso de tiempo del porcentaje de receptor de IL-6 soluble libre después de la administración de cada anticuerpo se muestra en la Fig. 20.

Cada uno de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 neutralizó receptor de IL-6 de mono cinomolgo de tipo membrana de una forma más sostenible, y suprimió el aumento de CRP durante un largo periodo cuando se comparó con TOCILIZUMAB y el control (el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido). Además, cada uno de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 neutralizó receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble de una forma más sostenible, y suprimió el aumento de receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble libre durante un periodo prolongado cuando se comparó con TOCILIZUMAB y el control. Estos hallazgos demuestran que todos de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 son superiores en sostener la neutralización de receptores de IL-6 de tipo membrana y solubles que TOCILIZUMAB y el control. De ellos, Fv3-M73 y Fv4-M73 son sorprendentemente superiores en sostener la neutralización. Mientras tanto, Fv5-M83 suprimió el CRP y el receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble libre más fuertemente que Fv3-M73 y Fv4-M73. Así, Fv5-M83 se considera que es más fuerte que Fv3-M73, Fv4-M73 y el control (el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido) en

neutralizar receptores de IL-6 de tipo membrana y solubles. Se consideró que los resultados *in vivo* de monos cinomolgos reflejan la afinidad más fuerte de Fv5-M83 para el receptor de IL-6 y la actividad biológica más fuerte de Fv5-M83 en el sistema de ensayo de BaF/gp130 con respecto al control.

5 Estos hallazgos sugieren que Fv3-M73 y Fv4-M73 son altamente superiores en sostener sus actividades como anticuerpo neutralizante anti-receptor de IL-6 cuando se compara con TOCILIZUMAB y el control, y así permiten reducir significativamente la dosificación y frecuencia de administración. Además, se demostró que Fv5-M83 era sorprendentemente superior en términos de la intensidad de la actividad como anticuerpo neutralizante anti-receptor de IL-6, además de sostener su actividad. Así, se espera que Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 sean útiles como antagonistas de IL-6 farmacéuticos.

10 [Ejemplo 9]

Se sabe que la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1 participa en la invasión celular de monocitos, linfocitos T, linfocitos NK y basófilos. Se ha informado que MCP-1 se expresa altamente en tejidos sinoviales/fluido sinovial de pacientes con AR (J. Clin. Invest., Sep 1992, 90(3):772-779) y se cree que participa en la afección patológica de AR (Inflamm. Allergy Drug Targets, Mar 2008, 7(1):53-66).

15 VEGF es un potente factor angiogénico y se sabe que se produce, por ejemplo, por macrófagos, fibroblastos y células sinoviales en la membrana sinovial de pacientes con AR (J. Rheumatol., Sep 1995, 22(9):1624-1630). Además, el nivel de VEGF en el suero de pacientes con RA se correlaciona con actividad de enfermedad y progresión radiográfica (Arthritis Rheum., Jun 2003, 48(6):1521-1529; y Arthritis Rheum., Sep 2001, 44(9):2055-2064) y el nivel de VEGF en el suero disminuye tratando pacientes con AR con el anticuerpo anti-IL-6R TOCILIZUMAB; por tanto, también se considera que  
20 VEGF desempeña una función importante en la afección patológica de AR (Mod. Rheumatol. 2009, 19(1):12-19; y Mediators Inflamm. 2008, 2008:129873).

Así, se examinó si TOCILIZUMAB y Fv4-M73 podían inhibir las producciones de MCP-1 y VEGF de células sinoviales derivadas de pacientes con AR humanos que se producen de la estimulación de sIL-6R y IL-6.

25 Se sembraron células sinoviales derivadas de pacientes con AR humanos (TOYOBO) sobre placas de 96 pocillos en 5 % de medio IMDM que contenía FCS a  $2 \times 10^4$  células/0,05 ml/pocillo, y se sembraron durante 90 minutos en una estufa de incubación de CO<sub>2</sub> (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Se añadieron 0,05 ml de TOCILIZUMAB y Fv4-M73 diluidos a concentraciones apropiadas, las placas se dejaron todavía durante 15 minutos, luego se añadieron 0,05 ml de receptor de IL-6 soluble (SR344: preparado según el método descrito en Ejemplos de referencia). Las placas se dejaron adicionalmente todavía durante 30 minutos, y se añadieron adicionalmente 0,05 ml de IL-6 (TORAY) (las concentraciones finales de receptor de  
30 IL-6 soluble y IL-6 fueron 50 ng/ml para cada uno). Después de dos días de cultivo, los sobrenadantes de cultivo se recogieron, y las concentraciones de MCP-1 y VEGF en los sobrenadantes de cultivo se midieron usando el kit de ELISA (Biosource and Pierce Biotechnology). Los resultados se muestran en las Fig. 21 y 22. TOCILIZUMAB y Fv4-M73 inhibieron la producción de MCP-1 y VEGF de células sinoviales derivadas de pacientes con AR humanos tras la estimulación del receptor de IL-6 soluble y IL-6 en un modo dependiente de la concentración.

35 Por consiguiente, la persistencia del efecto de Fv4-M73 como anticuerpo anti-receptor de IL-6 neutralizante (el efecto de la unión al receptor de IL-6 y el bloqueo de las señales del receptor de IL6 de tipo membrana y receptor de IL-6 soluble) es significativamente superior en comparación con TOCILIZUMAB, la frecuencia de administración y dosis pueden ser enormemente reducidas en comparación con TOCILIZUMAB, y además, Fv4-M73 inhibe la producción de MCP-1 y VEGF de células sinoviales derivadas de pacientes con AR humanos. Por tanto, se mostró que Fv4-M73 era un agente  
40 terapéutico muy eficaz contra AR.

#### Ejemplos de referencia

##### Preparación de receptor de IL-6 humano recombinante soluble

Se produjo receptor de IL-6 humano recombinante soluble del receptor de IL-6 humano, que es el antígeno, como se describe más adelante. Se generó una línea celular CHO que expresa constitutivamente un receptor de IL-6 soluble humano que contiene una secuencia de los aminoácidos 1° a 344° del extremo N informados en J. Biochem. (1990) 108,  
45 673-676 (Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825-828 (GenBank #X12830)). Se purificó receptor de IL-6 humano soluble de sobrenadante de cultivo de células CHO que expresan SR344 por tres cromatografías en columna: cromatografía en columna Blue Sepharose 6 FF, cromatografía de afinidad usando una columna inmovilizada con un anticuerpo específico para SR344 y cromatografía en columna de filtración en gel. La fracción eluida como el pico principal se usó como la  
50 muestra purificada final.

##### Preparación de receptor de IL-6 de mono cinomolgo recombinante soluble (cIL-6R)

Se prepararon cebadores de oligo-ADN basándose en la secuencia de genes para el receptor de IL-6 de mono Rhesus (Birney et al., Ensembl 2006, Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34 (Database issue):D556-61). Se preparó un fragmento de

ADN que codifica el gen del receptor de IL-6 de mono cinomolgo completo por PCR usando los cebadores, y como molde, ADNc preparado a partir del páncreas de mono cinomolgo. El fragmento de ADN resultante se insertó en un vector de expresión de células de mamífero y se preparó una línea CHO de expresión estable (línea celular CHO productora de cino.sIL-6R) usando el vector. El medio de cultivo de células CHO productoras de cino.sIL-6R se purificó usando una columna HisTrap (GE Healthcare Bioscience) y luego se concentró con Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore). Se obtuvo una muestra purificada final de receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble (en lo sucesivo cIL-6R) mediante más purificación sobre una columna de filtración en gel Superdex200pg16/60 (GE Healthcare Bioscience).

#### Preparación de IL-6 de mono cinomolgo recombinante (cIL-6)

Se preparó IL-6 de mono cinomolgo mediante el procedimiento descrito más adelante. Se preparó la secuencia de nucleótidos que codifica 212 aminoácidos depositada bajo el nº de acceso de SWISSPROT P79341 y se clonó en un vector de expresión de células de mamífero. El vector resultante se introdujo en células CHO para preparar una línea celular de expresión estable (línea celular CHO productora de cino.IL-6). El medio de cultivo de células productoras de cino.IL-6 se purificó usando una columna SP-Sepharose/FF (GE Healthcare Bioscience) y a continuación se concentró con Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore). Se obtuvo una muestra purificada final de IL-6 de mono cinomolgo (en lo sucesivo cIL-6) mediante más purificación sobre una columna de filtración en gel Superdex75pg26/60 (GE Healthcare Bioscience), seguido de concentración con Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore).

#### Preparación de un anticuerpo anti-receptor de IL-6a de alta afinidad conocido

Se construyó un vector de expresión de células de mamífero para expresar hlgG1 VQ8F11-21, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido. Se describe hlgG1 VQ8F11-21 en el documento US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1; las secuencias de aminoácidos de la cadena H y la cadena L como se exponen en SEQ ID NO: 77 y 78, respectivamente). La región variable del anticuerpo se construyó por PCR usando una combinación de oligo-ADN sintéticos (PCR de ensamblaje) y se usó IgG1 para la región constante. Las regiones variables y constantes del anticuerpo se combinaron juntas por PCR de ensamblaje, y luego se insertaron en un vector de expresión de mamífero para construir vectores de expresión para la cadena H y la cadena L de interés. Las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes se determinaron por un método conocido para aquellos expertos en la materia. El anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad (en lo sucesivo abreviado "control") se expresó y se purificó usando los vectores de expresión construidos por el método descrito en el Ejemplo 1.

#### Preparación, expresión y purificación de variantes de TOCILIZUMAB

Se prepararon variantes de TOCILIZUMAB usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Los fragmentos de plásmidos resultantes se insertaron en vectores de expresión de células de mamífero para construir vectores de expresión para las cadenas H y las cadenas L de interés. Las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión obtenidos se determinaron por un método conocido para los expertos en la materia. Los anticuerpos se expresaron por el método descrito más adelante. Se suspendió la línea celular HEK293H derivada de cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) en DMEM (Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal (Invitrogen). Las células se sembraron a 10 ml por placa en placas para células adherentes (10 cm de diámetro; CORNING) a una densidad celular de 5 a 6 x 10<sup>5</sup> células/ml y se cultivaron en una estufa de incubación de CO<sub>2</sub> (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>) durante un día y noche completo. Entonces, el medio se eliminó por aspiración y se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen). El plásmido preparado se introdujo en las células por el método de lipofección. Los sobrenadantes de cultivo resultantes se recogieron, se centrifugaron (aproximadamente 2000 g, 5 min, temperatura ambiente) para eliminar las células y se esterilizaron filtrando a través de un filtro de 0,22 µm MILLEX(R)-GV (Millipore) para obtener los sobrenadantes. Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos por un método conocido para aquellos expertos en la materia usando rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). Para determinar la concentración del anticuerpo purificado, la absorbancia se midió a 280 nm usando un espectrofotómetro. Las concentraciones de anticuerpo se calcularon a partir de los valores determinados usando un coeficiente de absorbancia calculado por el método PACE (Protein Science 1995; 4:2411-2423).

#### Establecimiento de una línea celular BaF3 que expresa gp130 humano

Se estableció una línea celular BaF3 que expresa gp130 humano mediante el procedimiento descrito a continuación para obtener una línea celular que prolifera en un modo dependiente de IL-6.

Se amplificó un ADNc de gp130 humano de longitud completa (Hibi et al., Cell (1990) 63:1149-1157 (GenBank #NM\_002184)) por PCR y se clonó en el vector de expresión pCOS2Zeo para construir pCOS2Zeo/gp130. pCOS2Zeo es un vector de expresión construido eliminando la región de expresión génica de DHFR de pCHOI (Hirata et al., FEBS Letter (1994) 356:244-248) e insertando la región de expresión del gen de resistencia de zeocina. Se amplificó el ADNc de IL-6R humano de longitud completa por PCR y se clonó en pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) para construir hIL-6R/pcDNA3.1(+).

Se mezclaron 10 µg de pCOS2Zeo/gp130 con células BaF3 ( $0,8 \times 10^7$  células) suspendidas en PBS, y a continuación se pulsaron a 0,33 kV y 950 µFD usando Gene Pulser (Bio-Rad). Las células BaF3 que tienen el gen introducido por electroporación se cultivaron durante un día y noche completo en medio RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con 0,2 ng/ml de interleucina-3 de ratón (PeproTech) y 10 % de suero bovino fetal (en lo sucesivo FBS, HyClone), y se seleccionaron añadiendo medio RPMI 1640 complementado con 100 ng/ml de interleucina-6 humana (R&D Systems), 100 ng/ml de receptor soluble de interleucina-6 humano (R&D Systems) y 10 % de FBS para establecer una línea celular BaF3 que expresa gp130 humano (en lo sucesivo "BaF3/gp130"). Esta BaF/gp130 prolifera en presencia de interleucina-6 humana (R&D Systems) y receptor de IL-6 humano soluble, y así puede usarse para evaluar la actividad de inhibición del crecimiento (o actividad neutralizante del receptor de IL-6) de un anticuerpo anti-receptor de IL-6.

#### 10 Evaluación de la actividad biológica por células BaF3 que expresan gp130 humano (BaF/gp130)

Se evaluó la actividad neutralizante del receptor de IL-6 usando BaF3/gp130 que prolifera de un modo dependiente de IL-6/receptor de IL-6. Después de tres lavados con RPMI 1640 complementado con 10 % de FBS, las células BaF3/gp130 se suspendieron a  $5 \times 10^4$  células/ml en RPMI 1640 complementado con 600 ng/ml o 60 ng/ml de interleucina-6 humana (TORAY) (concentración final de 300 ng/ml o 30 ng/ml), cantidad apropiada de receptor de IL-6 humano soluble y 10 % de FBS. Las suspensiones de células se dispensaron (50 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos (CORNING). A continuación, los anticuerpos purificados se diluyeron con RPMI 1640 que contenía 10 % de FBS, y se añadieron a cada pocillo (50 µl/pocillo). Las células se cultivaron a 37 °C bajo 5 % de CO<sub>2</sub> durante tres días. Se diluyó reactivo WST-8 (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories) dos veces con PBS. Inmediatamente después de añadirse 20 µl de reactivo a cada pocillo, se midió la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) usando SUNRISE CLASSIC (TECAN). Después de cultivar durante dos horas, la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) se midió de nuevo. La actividad neutralizante del receptor de IL-6 se evaluó usando el cambio de absorbancia durante dos horas como indicador.

#### Análisis basado en Biacore de la unión al receptor de IL-6 humano soluble

Se analizó la reacción cinética de antígeno-anticuerpo usando Biacore T100 (GE Healthcare). Se midió la interacción de receptor de IL-6 soluble humano-anticuerpo inmovilizando cantidades apropiadas de proteína A o proteína A/G o F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG (específico de cadena γ) sobre un chip sensor por el método de acoplamiento de aminas, uniendo anticuerpos de interés sobre el chip a pH 7,4, y luego migrando el receptor de IL-6 soluble ajustado a diversas concentraciones a pH 7,4 sobre el chip como analito. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 37 °C. Los parámetros cinéticos, constante de asociación  $k_a$  (1/Ms) y constante de disociación  $k_d$  (1/s) se calcularon a partir de los sensogramas obtenidos por medición. Entonces, se determinó  $K_D$  (M) basándose en las constantes de velocidad. Se determinaron los parámetros respectivos usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare).

#### Evaluación de la disociación dependiente del pH del receptor de IL-6 de tipo membrana usando Biacore

Se observó la reacción de antígeno-anticuerpo con el receptor de IL-6 de tipo membrana a pH 5,8 y pH 7,4 usando Biacore T100 (GE Healthcare). La unión al receptor de IL-6 de tipo membrana se evaluó evaluando la unión al receptor de IL-6 soluble humano inmovilizado sobre el chip sensor. Se biotiniló SR344 por un método conocido para aquellos expertos en la materia. Basándose en la afinidad entre la biotina y la estreptavidina, el receptor de IL-6 soluble humano biotinilado se inmovilizó sobre el chip sensor mediante estreptavidina. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C. El tampón de fase móvil fue MES 10 mM (pH 5,8), NaCl 150 mM y 0,05 % de Tween 20. Se inyectó un clon que presentaba unión dependiente del pH bajo la condición de pH 7,4 para unirse al receptor de IL-6 soluble humano (el tampón de muestra de inyección fue MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM y 0,05 % de Tween 20). Entonces, se observó la disociación dependiente del pH de cada clon a pH 5,8, que es el pH de la fase móvil. Se calculó la constante de disociación ( $k_d$  (1/s)) a pH 5,8 usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) ajustando solo la fase de disociación a pH 5,8. La concentración de muestra fue 0,25 µg/ml. La unión se llevó a cabo en MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM y 0,05 % de Tween 20, y la disociación se llevó a cabo en MES 10 mM (pH 5,8), NaCl 150 mM y 0,05 % de Tween 20. Asimismo, se calculó la constante de disociación ( $k_d$  (1/s)) a pH 7,4 usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) ajustando solo la fase de disociación a pH 7,4. La concentración de muestra fue 0,5 µg/ml. La unión se llevó a cabo en MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM y 0,05 % de Tween 20, y la disociación se llevó a cabo en MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM y 0,05 % de Tween 20.

#### Evaluación de la unión a FcRn humano

El FcRn es un complejo de FcRn y β2-microglobulina. Se prepararon cebadores de oligo-ADN basados en la secuencia de genes de FcRn humano desvelada (J. Exp. Med. (1994) 180(6):2377-2381). Se preparó un fragmento de ADN que codifica el gen completo por PCR usando ADNc humano (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) como molde y los cebadores preparados. Usando el fragmento de ADN obtenido como molde, un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular que contiene la región señal (Met1-Leu290) se amplificó por PCR, y se insertó en un vector de expresión de células de mamífero (la secuencia de aminoácidos de FcRn humano como se expone en SEQ ID NO: 79). Asimismo, se prepararon cebadores de oligo-ADN basándose en la secuencia del gen de β2-microglobulina humana desvelada (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2002) 99(26):16899-16903). Se preparó un fragmento de ADN que codifica el gen

completo por PCR usando ADNc humano (Hu-Placenta Marathon-Ready cDNA, CLONTECH) como molde y los cebadores preparados. Usando el fragmento de ADN obtenido como molde, se amplificó un fragmento de ADN que codifica la  $\beta$ 2-microglobulina completa que contiene la región señal (Met1-Met119) por PCR y se insertó en un vector de expresión de células de mamífero (la secuencia de aminoácidos de  $\beta$ 2-microglobulina humana como se expone en SEQ ID NO: 80).

Se expresó FcRn humano soluble por el siguiente procedimiento. Los plásmidos contruidos para FcRn humano y  $\beta$ 2-microglobulina se introdujeron en células de la línea celular HEK293H derivada de cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) usando 10 % de FBS (Invitrogen) por lipofección. El sobrenadante de cultivo resultante se recogió, y se purificó FcRn usando IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) por el método descrito en J. Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5171-80, seguido de más purificación usando HiTrap Q HP (GE Healthcare).

Determinación de la concentración de anticuerpo en plasma de ratón

Se determinaron concentraciones de anticuerpo en plasma de ratón por ELISA según un método conocido para aquellos expertos en la materia.

Prueba de PK/PD para determinar la concentración de anticuerpo en el plasma, concentración de CRP y receptor de IL-6 soluble libre en monos

Las concentraciones plasmáticas en monos cinomolgos se determinaron por ELISA usando un método conocido para aquellos expertos en la materia.

La concentración de CRP se determinó con un analizador automatizado (TBA-120FR; Toshiba Medical Systems Co.) usando Cias R CRP (KANTO CHEMICAL CO., INC.).

La concentración plasmática de receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble libre en monos cinomolgos se determinó mediante el procedimiento descrito a continuación. Todos los anticuerpos de tipo IgG (IgG de mono cinomolgo, anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano y complejo de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano-receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble) en el plasma se adsorbieron sobre proteína A cargando 30  $\mu$ l de plasma de mono cinomolgo sobre una cantidad apropiada de resina rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) secada en una copa de filtro de 0,22  $\mu$ m (Millipore). Entonces, la disolución en la copa se centrifugó usando una centrífuga de alta velocidad para recoger la disolución que pasó a través. La disolución que pasó a través no contiene complejo de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano-receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble unido a la proteína A. Por tanto, la concentración de receptor de IL-6 soluble libre puede determinarse midiendo la concentración de receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble en la disolución que pasó a través de la proteína A. La concentración de receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble se determinó usando un método conocido para aquellos expertos en la materia para medir las concentraciones de receptor de IL-6 humano soluble. Se usó receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble (cIL-6R) preparado como se ha descrito anteriormente como patrón. El porcentaje de receptor de IL-6 soluble libre se calculó por la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{Concentración de receptor de IL – 6 soluble libre después de la administración de anticuerpo}}{\text{Concentración de receptor de IL – 6 soluble antes de la administración de anticuerpo}} \times 100$$

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Moléculas de anticuerpo mejoradas

<130> C1-A0805Y2P

<150> JP 2008-248213

<151> 26-09-2008

<150> JP 2009-60806

<151> 13-03-2009

<150> JP 2009-67925

<151> 19-03-2009

5

<160> 117

<170> PatentIn versión 3.4

10

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 1

20

**His Asp His Ala Trp Ser**  
**1 5**

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

30

<400> 2

**Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Gly**  
**1 5 10 15**

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 3

10 **Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

20 <400> 4

**His Asp His Ala Trp Ser**  
**1 5**

<210> 5

25 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 5

ES 2 546 800 T3

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 6

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 6

Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

15 <210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 7

25

Asp Asp His Ala Val Ser  
1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

ES 2 546 800 T3

<400> 8

**Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Asp**

5            **1**                            **5**                            **10**                            **15**

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

10            <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

15            <400> 9

**Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val**  
**1**                            **5**                            **10**

<210> 10

20            <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25            <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 10

**Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His Leu Asn**  
**1**                            **5**                            **10**

30

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 546 800 T3

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

5 <400> 11

**Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser**  
**1 5**

<210> 12

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 12

**Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr**  
**1 5**

20

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 13

30

**Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His Leu Asn**  
**1 5 10**

<210> 14

<211> 7



ES 2 546 800 T3

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 17

10

**Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser**  
**1 5**

<210> 18

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

20

<400> 18

**Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr**  
**1 5**

25

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 19

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val 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 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 20

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 20

ES 2 546 800 T3

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

<210> 21

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 21

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu  
 50 55 60

Gln Asp Arg Val 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 Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val Trp Gly Glu Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 22

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 22

ES 2 546 800 T3

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu  
 100 105

<210> 23

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 23

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His  
 20 25 30

ES 2 546 800 T3

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu  
 100 105

<210> 24

<211> 107

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 24

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu  
 100 105

15

<210> 25

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 25

ES 2 546 800 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp  
 20 25 30  
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val 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 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu  
 210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

ES 2 546 800 T3

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440

<210> 26

<211> 443

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 26

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val 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 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly  
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

ES 2 546 800 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440

<210> 27

<211> 447

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 27

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp  
          20                   25                   30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu

ES 2 546 800 T3

50		55		60											
Gln	Asp	Arg	Val	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	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Thr	Ala	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Glu	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135						140			
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320

ES 2 546 800 T3

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

<210> 28

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 28

ES 2 546 800 T3

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

<210> 29

5 <211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 29

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

5

<210> 30

<211> 214

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 30

5

```

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50           55           60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
    
```

<210> 31

10

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

5

<400> 31

```

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

ES 2 546 800 T3

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140  
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175  
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270  
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Pro

<210> 32

<211> 324

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 32

5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

ES 2 546 800 T3

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 33

<211> 328

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 33

ES 2 546 800 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys



ES 2 546 800 T3

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 34

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

5

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

15 <400> 35



ES 2 546 800 T3

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

<210> 37

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 37

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60  
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120  
 tggaagggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180  
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240  
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcaciaag 300  
 10 agcttcaaca ggggagagtg ttgataa 327

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 38



ES 2 546 800 T3

```

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

```

<210> 40

<211> 330

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35          40          45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50          55          60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85          90          95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100         105         110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115         120         125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130         135         140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145         150         155         160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165         170         175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180         185         190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195         200         205

```

10

ES 2 546 800 T3

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 41

<211> 984

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

gctagcacca agggcccac ggtcttcccc ctggcgccct cctccaagag cacctccgag 60

agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120

tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300

aaatcttgtg tcgagtgcc accgtgccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360

ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc 420

gtgggtggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggtg cgtggacggc 480

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540

gtggtcagcg tcctcacctg cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600

aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccattctcaa aaccaaaggg 660

cagccccgag aaccacaggt gtacacctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720

caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780

10

ES 2 546 800 T3

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840  
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 960  
 tcctgtcttc cgggtaaatg ataa 984

<210> 42  
 <211> 326  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 42

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

ES 2 546 800 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 43

<211> 995

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 43

ES 2 546 800 T3

```

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag    60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg    120
tggaactcag gcgccttgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtect acagtctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc    240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc    300
aaatatggtc ccccatgccc accatgcccga gcacctgagt tctctggggg accatcagtc    360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg    420
tgctgtgggg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat    480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac    540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag    600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa    660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag    720
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag    780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc    840
gacggtctct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg    900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc    960
ctctccctgt ctctgggta atgataagcg gcgcg    995

```

<210> 44

5 <211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

10

ES 2 546 800 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

ES 2 546 800 T3

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 325

<210> 45

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 45

Gly Gly Gly Ser  
 1

15 <210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 46

5

**Ser Gly Gly Gly**  
**1**

<210> 47

<211> 5

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

15

<400> 47

**Gly Gly Gly Gly Ser**  
**1 5**

20

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 48

30

**Ser Gly Gly Gly Gly**  
**1 5**

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

5

<400> 49

**Gly Gly Gly Gly Gly Ser**  
**1 5**

10

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 50

**Ser Gly Gly Gly Gly Gly**  
**1 5**

20

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

30

<400> 51

**Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser**  
**1 5**

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 52

10

**Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly**  
**1 5**

<210> 53

<211> 449

<212> PRT

15

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

20

<400> 53

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

ES 2 546 800 T3

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

ES 2 546 800 T3

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 54

<211> 214

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 54

ES 2 546 800 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 55

5 <211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

ES 2 546 800 T3

<400> 55

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

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

ES 2 546 800 T3

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 56

10

```

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

ES 2 546 800 T3

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 57

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 57

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly  
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

ES 2 546 800 T3

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 58

5

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 58

```

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210
    
```

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10 <400> 59

**Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser**  
**1 . 5**

<210> 60

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 60

**Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser**  
**1 5**

25

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 61

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
 20 25 30

<210> 62

5 <211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 62

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser  
 20 25 30

15 <210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 63

25 Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 64

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 64

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

10

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 65

<211> 30

<212> PRT

15

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

20

<400> 65

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser  
20 25 30

<210> 66

25

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 66

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly  
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220

ES 2 546 800 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 67

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 546 800 T3

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 67

```

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln His Ile Ser Ser His
20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35           40           45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100          105          110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

5

<210> 68

<211> 448

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 68

5

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

ES 2 546 800 T3

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

<210> 69

<211> 447

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 69

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

ES 2 546 800 T3

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

<210> 70

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 70

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

ES 2 546 800 T3

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 71

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 71



ES 2 546 800 T3

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu  
 210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270  
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

ES 2 546 800 T3

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 72

<211> 443

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 72

ES 2 546 800 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

ES 2 546 800 T3

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

ES 2 546 800 T3

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440

<210> 73

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 73



ES 2 546 800 T3

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

ES 2 546 800 T3

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 74

<211> 447

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 74

ES 2 546 800 T3

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

ES 2 546 800 T3

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445



ES 2 546 800 T3

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440

<210> 76

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 76

5

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp  
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu  
 50 55 60

Gln Asp Arg Val 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 Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val Trp Gly Glu Gly  
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220

ES 2 546 800 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 77

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>



ES 2 546 800 T3

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

<210> 78

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 78

ES 2 546 800 T3

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

<210> 79

5

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

ES 2 546 800 T3

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro  
 20 25 30  
 Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys  
 35 40 45  
 Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu  
 50 55 60  
 Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys  
 65 70 75 80  
 Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys  
 85 90 95  
 Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu  
 100 105 110  
 Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly  
 115 120 125  
 Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln  
 130 135 140  
 Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro  
 145 150 155 160  
 His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp  
 165 170 175  
 Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly  
 180 185 190  
 Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu  
 195 200 205  
 Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly  
 210 215 220  
 Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His  
 245 250 255  
 Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu  
 260 265

<210> 80

5 <211> 99

<212> PRT

ES 2 546 800 T3

<213> Homo sapiens

<400> 80

```

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

5

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

15

<400> 81

```

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15
    
```

<210> 82

20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 546 800 T3

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 82

5

**Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 83

<211> 16

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

15

<400> 83

**Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser**  
**1 5 10 15**

20

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 84

30

**Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

5

<400> 85

**Leu Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

10

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 86

**Ser Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

20

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

30

<400> 87

**Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn**  
**1 5 10**



ES 2 546 800 T3

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

5 <210> 91  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 91

Gly Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr  
1 5

15 <210> 92  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 92

Gln Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr  
1 5

25 <210> 93  
<211> 30  
<212> PRT  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada



<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 96

**Asp Asp His Ala Trp Ser**  
**1 5**

10

<210> 97

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 97

20

**Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly**  
**1 5 10**

<210> 98

<211> 14

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

30

<400> 98

**Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly**  
**1 5 10**



ES 2 546 800 T3

Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

5 <210> 102

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 102

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

15 <210> 103

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 103

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys  
20

25

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

5 <400> 104

**Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn**  
**1 . . . . . 5 . . . . . 10**

<210> 105

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 105

**Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr**  
**1 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15**

20

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 106

30

**Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr**  
**1 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15**

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 107

**Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser**  
**1 . . . . . 5**

10

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 108

20

**Tyr Thr Ser Glu Leu Glu Ser**  
**1 . . . . . 5**

<210> 109

<211> 7

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

30

<400> 109

**Tyr Thr Ser Arg Leu Leu Ser**  
**1 . . . . . 5**

ES 2 546 800 T3

<210> 110

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 110

10

**Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**  
**1 5 10 15**

**Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

<210> 111

<211> 32

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

20

<400> 111

**Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr**  
**1 5 10 15**

**Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys**  
**20 25 30**

25

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 112

**Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
**1 5 10**

5

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 113

**Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu**  
**1 5 10**

15

<210> 114

<211> 30

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

25

<400> 114

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

**Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly His Ser Ile Thr**  
**20 25 30**

30

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

5

<400> 115

**His Asp His Ala Trp Ser**  
**1 5**

10

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

<400> 116

**Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His Leu Asn**  
**1 5 10**

20

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de polipéptidos artificialmente sintetizada

30

<400> 117

**Tyr Thr Ser His Leu His Ser**  
**1 5**

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de uno cualquiera de:
  - 5 (a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20 (región variable de VH3-M73) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 (región variable de VL3);
  - (b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (región variable de VH4-M73) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 (región variable de VL1); y
  - 10 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21 (región variable de VH5-M83) y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24 (región variable de VL5).
2. Un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de uno cualquiera de:
  - 15 (a) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 (VH3-M73) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 (VL3);
  - (b) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25 (VH4-M73) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 (VL1); y
  - (c) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27 (VH5-M83) y una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30 (VL5).
3. Un gen que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2.
- 20 4. Un vector que lleva el gen de la reivindicación 3.
5. Una célula huésped que lleva el vector de la reivindicación 4.
6. Un método para producir el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 cultivando la célula huésped de la reivindicación 5.
7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 o un anticuerpo producido por el método de la reivindicación 6.

CLASIFICACIÓN CDR	SECUENCIA DE CDR DE TOCILIZUMAB	SITIO DE MUTACIÓN (Kabat nº)	AMINOÁCIDO DE TOCILIZUMAB	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MUTACIÓN	SECUENCIA DE CDR DESPUÉS DE LA MUTACIÓN
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS	50	Y	F	FISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 82)
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 81)	58	T	N	YISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 83)
HCDR3	SLARTTAMDY	95	S	L	LLARTTAMDY (SEQ ID NO: 85)
HCDR3	SLARTTAMDY (SEQ ID NO: 84)	99	T	A	SLARATAMDY (SEQ ID NO: 86)
LCDR1	RASQDISSYLN	27	Q	T	RASTDISSYLN (SEQ ID NO: 88)
LCDR1	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 87)	27	Q	R	RASRDISSYLN (SEQ ID NO: 89)
LCDR3	QQGNTLPYT	89	Q	G	GQGNTLPYT (SEQ ID NO: 91)
LCDR3	QQGNTLPYT (SEQ ID NO: 90)	93	T	R	QQGNRLPYT (SEQ ID NO: 92)

FIG. 1

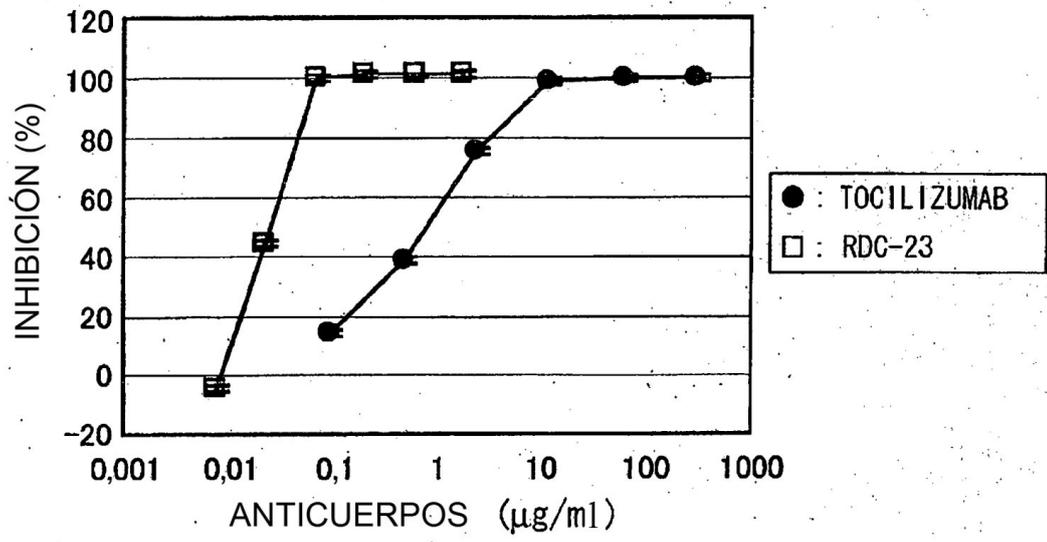


FIG. 2

CLASIFICACIÓN	SECUENCIA DE TOCILIZUMAB	SITIO DE MUTACIÓN (Kabat n°)	AMINOÁCIDO DE TOCILIZUMAB	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MUTACIÓN	SECUENCIA DESPUÉS DE LA MUTACIÓN
HFR1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTC TVSGYSIT (SEQ ID NO: 93)	13	R	K	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTC AVSGYSIS (SEQ ID NO: 94)
		16	Q	E	
		23*	T	A	
HCDR1	SDHAWS (SEQ ID NO: 95)	30*	T	S	DDHAWS (SEQ ID NO: 96)
		31	S	D	
HFR2	WVRQPPGKGLVWIG (SEQ ID NO: 97)	43	R	E	WVRQPPGKGLVWIG (SEQ ID NO: 98)
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 81)	64	K	Q	YISYSGITTYNPSLQD (SEQ ID NO: 99)
		65	S	D	
HFR4	WGQGSGLTVSS (SEQ ID NO: 100)	105	Q	E	WGQGSGLTVSS (SEQ ID NO: 101)
		107*	S	T	
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEQ ID NO: 102)	18	R	S	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC (SEQ ID NO: 103)
LCDR1	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 87)	24	R	Q	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 104)
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 105)	45	K	E	WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 106)
LCDR2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 107)	53	R	E	YTSELES (SEQ ID NO: 108)
		55	H	E	
		55	H	L	
LFR3	GVPSRFSGSGSDFTFTISSLQPE DIATYYC (SEQ ID NO: 110)	80	Q	E	GVPSRFSGSGSDFTFTISSLQPE DAATYYC (SEQ ID NO: 111)
		81*	P	A	
		83*	I	A	
LFR4	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 112)	107	K	E	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 113)

FIG. 3

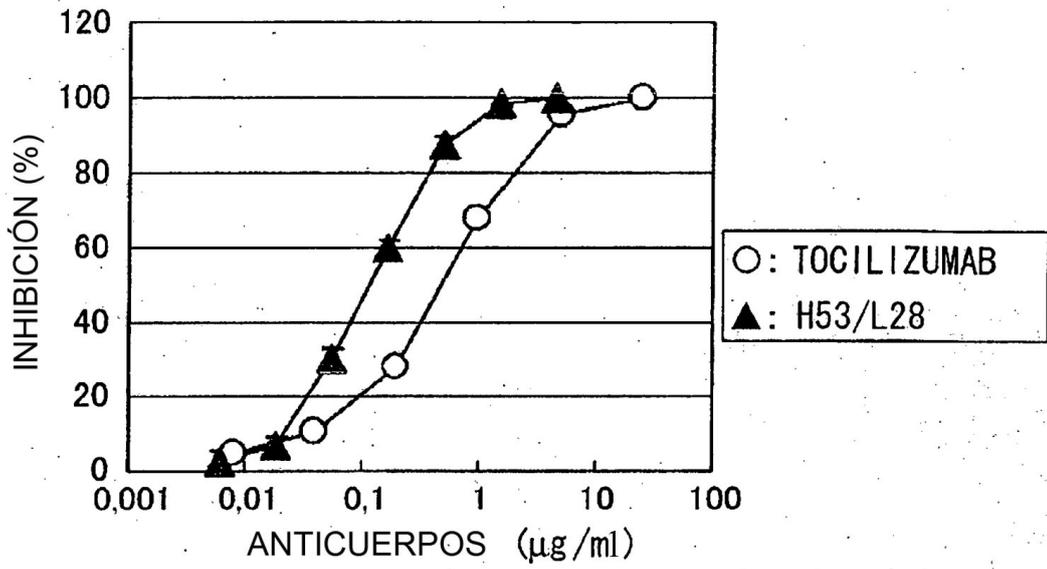


FIG. 4

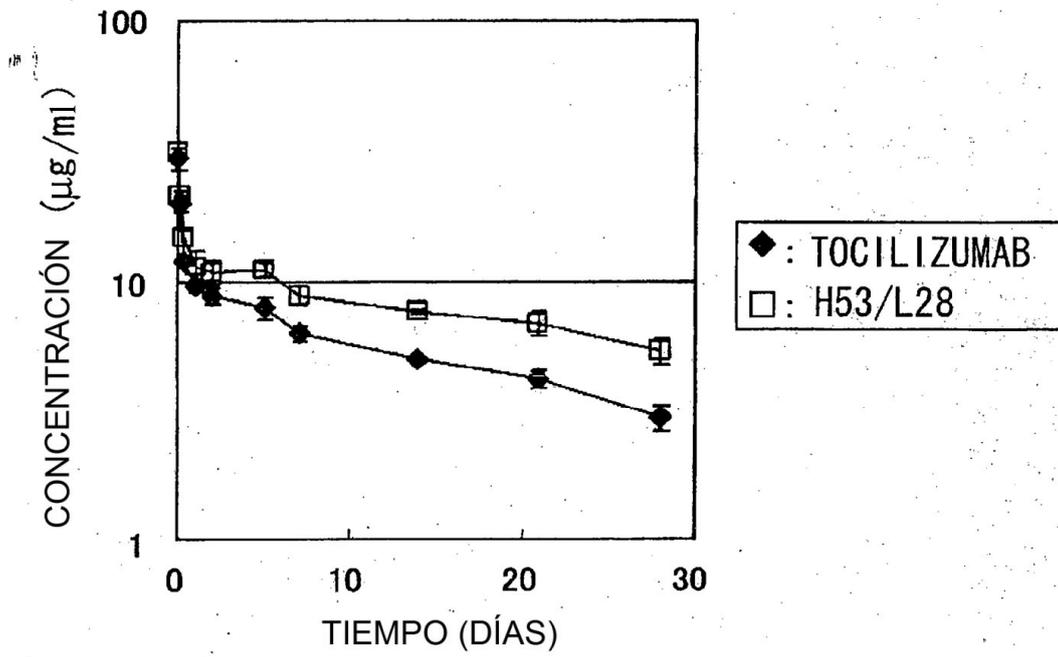


FIG. 5

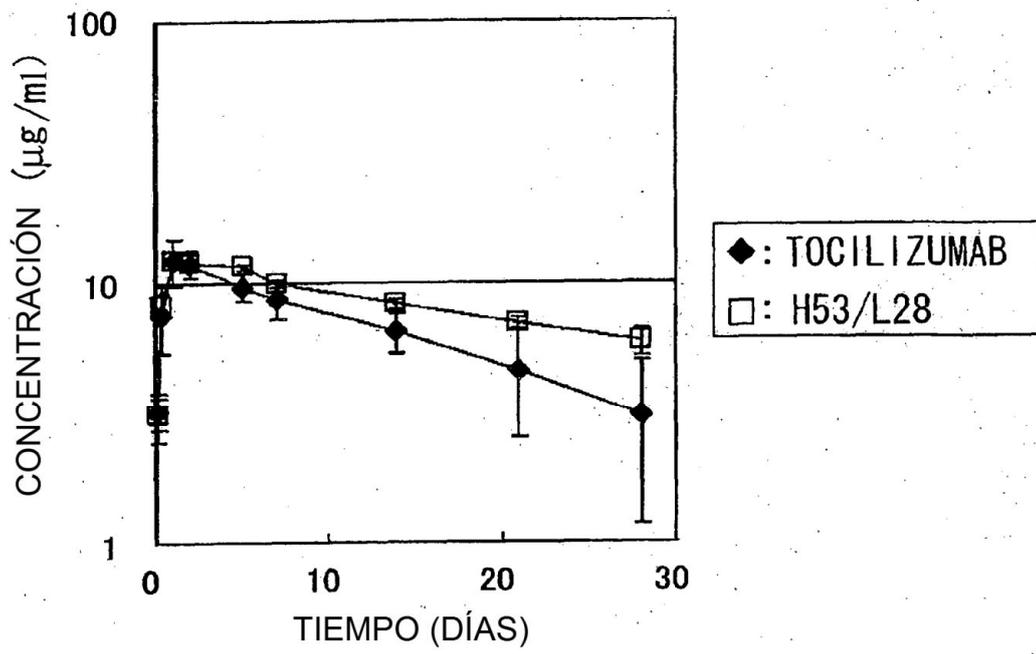


FIG. 6

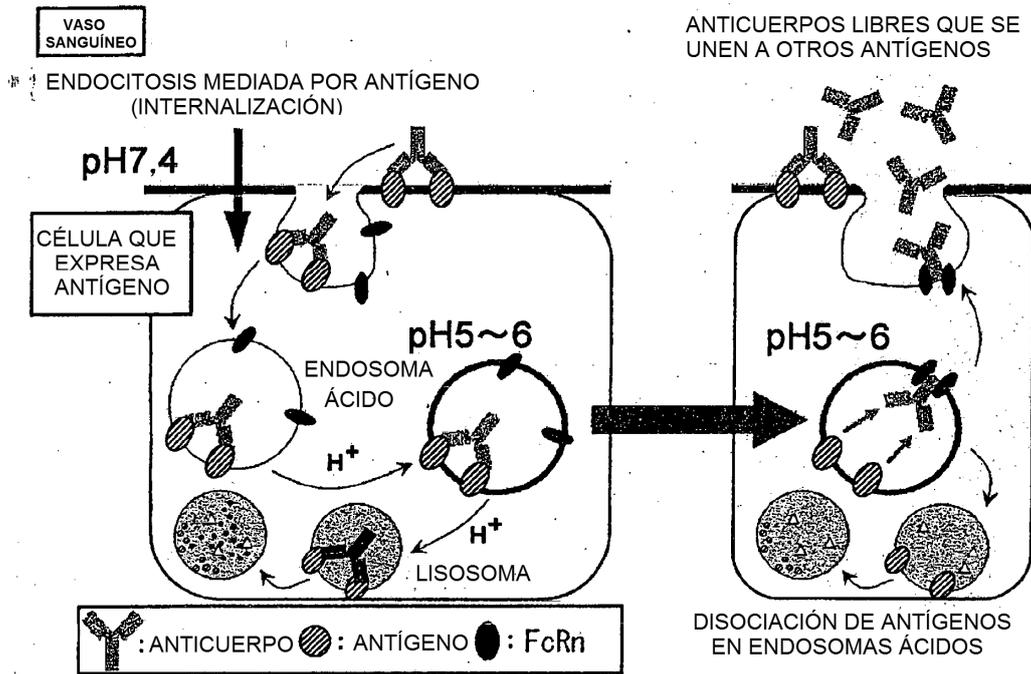


FIG. 7

CLASIFICACIÓN	SECUENCIA DE TOCILIZUMAB	SITIO DE MUTACIÓN (Kabat nº)	AMINOÁCIDO DE TOCILIZUMAB	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MUTACIÓN	SECUENCIA DESPUÉS DE LA MUTACIÓN
HFR1	QVQLQESGPGGLVLRPSQTL LTCTVSGYSIT (SEQ ID NO: 93)	27	Y	H	QVQLQESGPGGLVLRPSQTL LTCTVSGHSIT (SEQ ID NO: 114)
HCDR1	SDHAWS (SEQ ID NO: 95)	31	S	H	HDHAWS (SEQ ID NO: 115)
LCDR1	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 87)	32	Y	H	RASQDISSHLN (SEQ ID NO: 116)
LCDR2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 107)	53	R	H	YTSHLHS (SEQ ID NO: 117)

FIG. 8

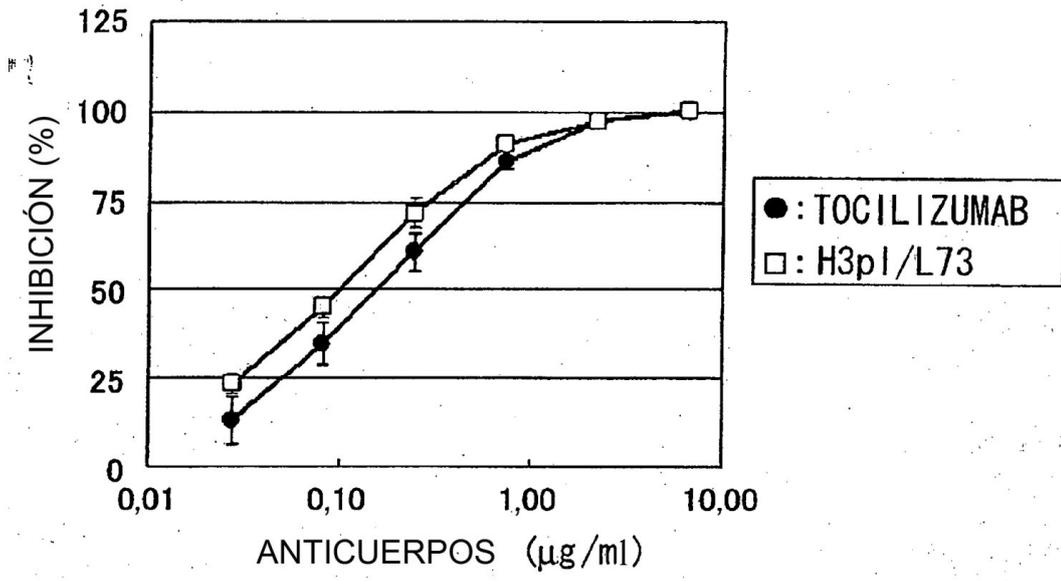


FIG. 9

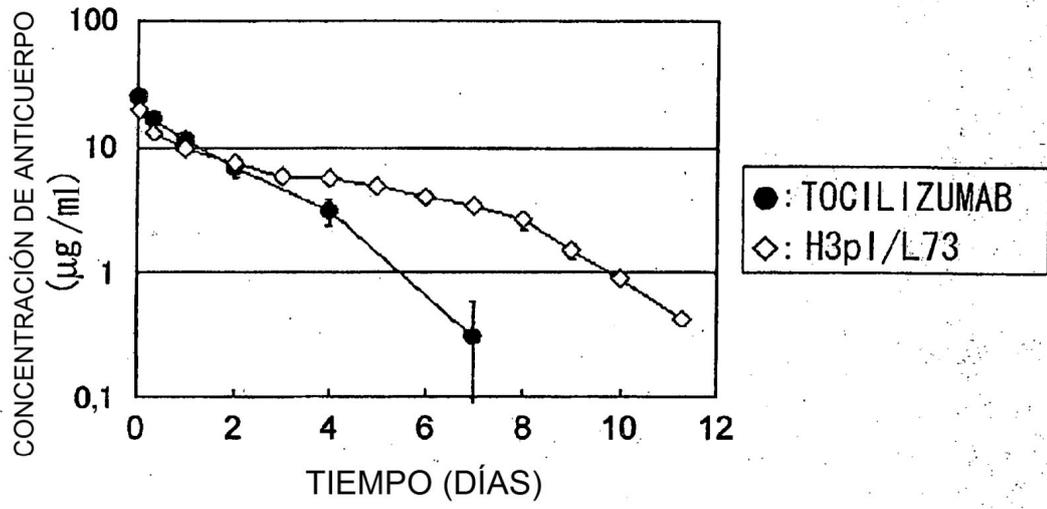


FIG. 10

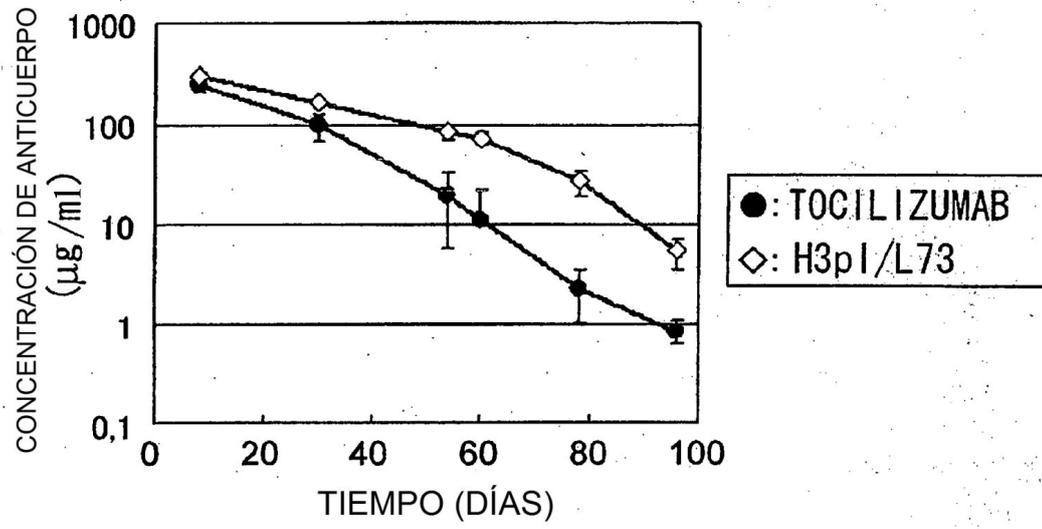


FIG. 11

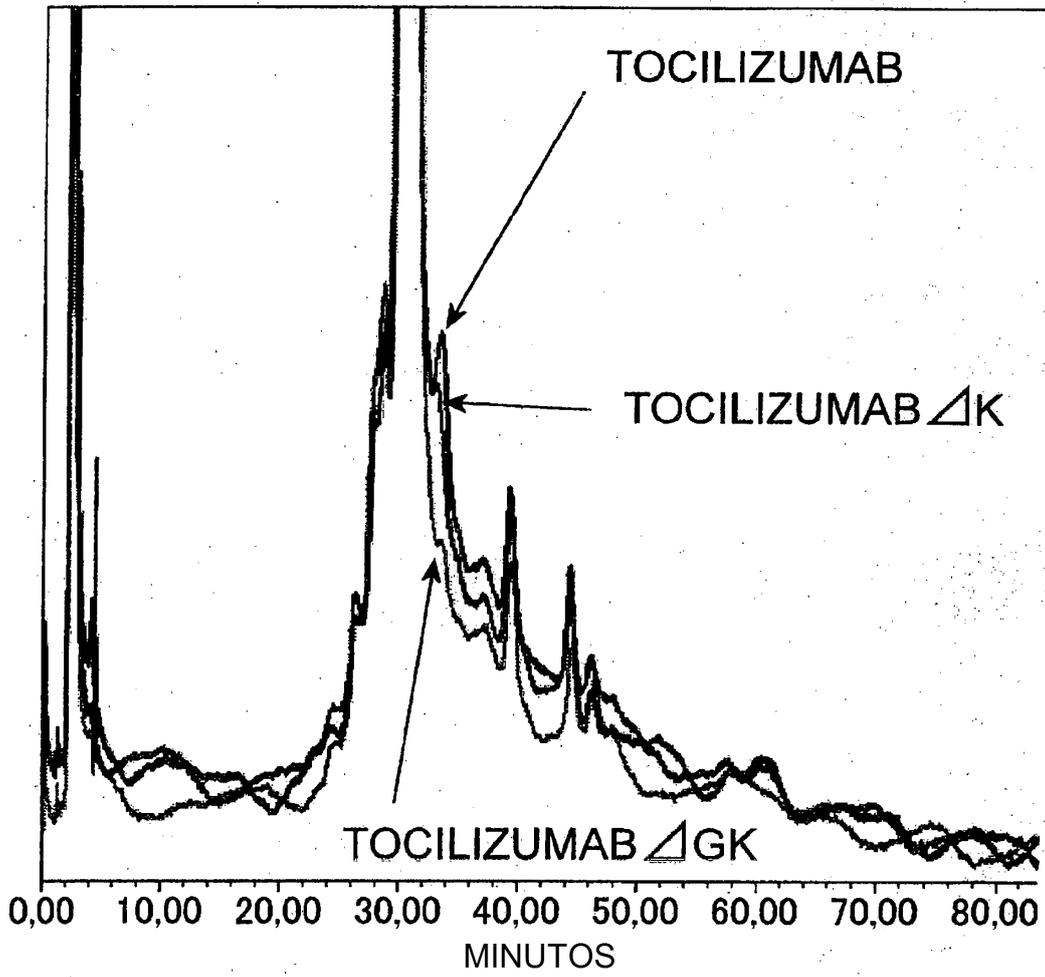


FIG. 12

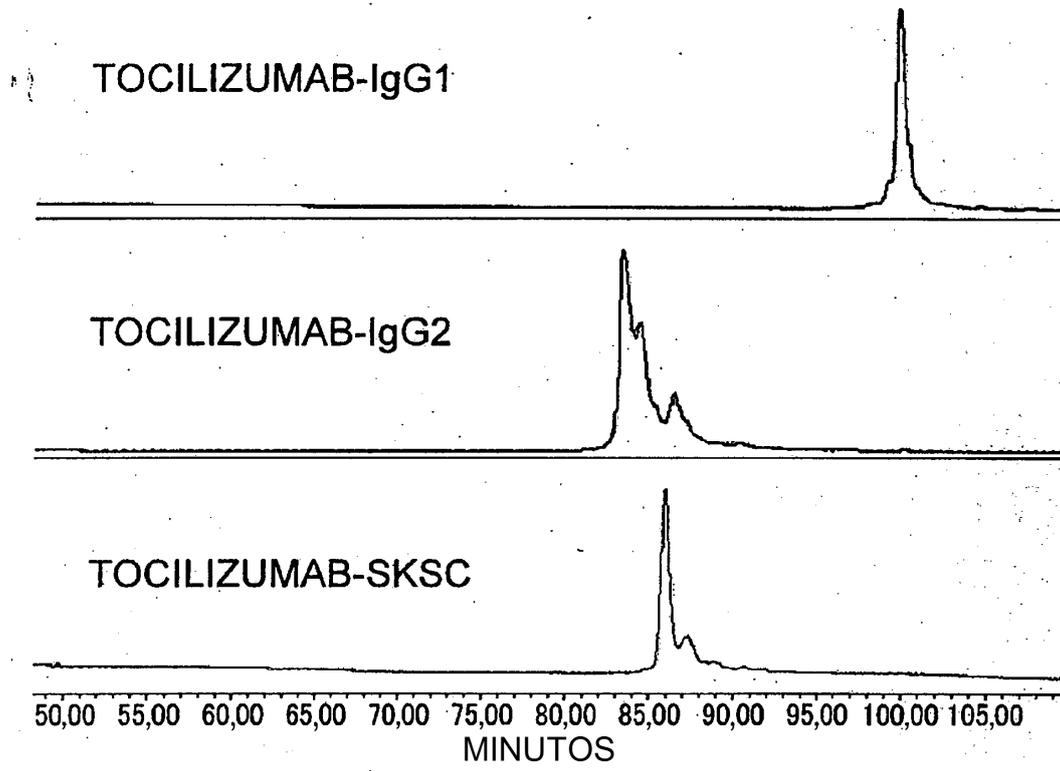


FIG. 13

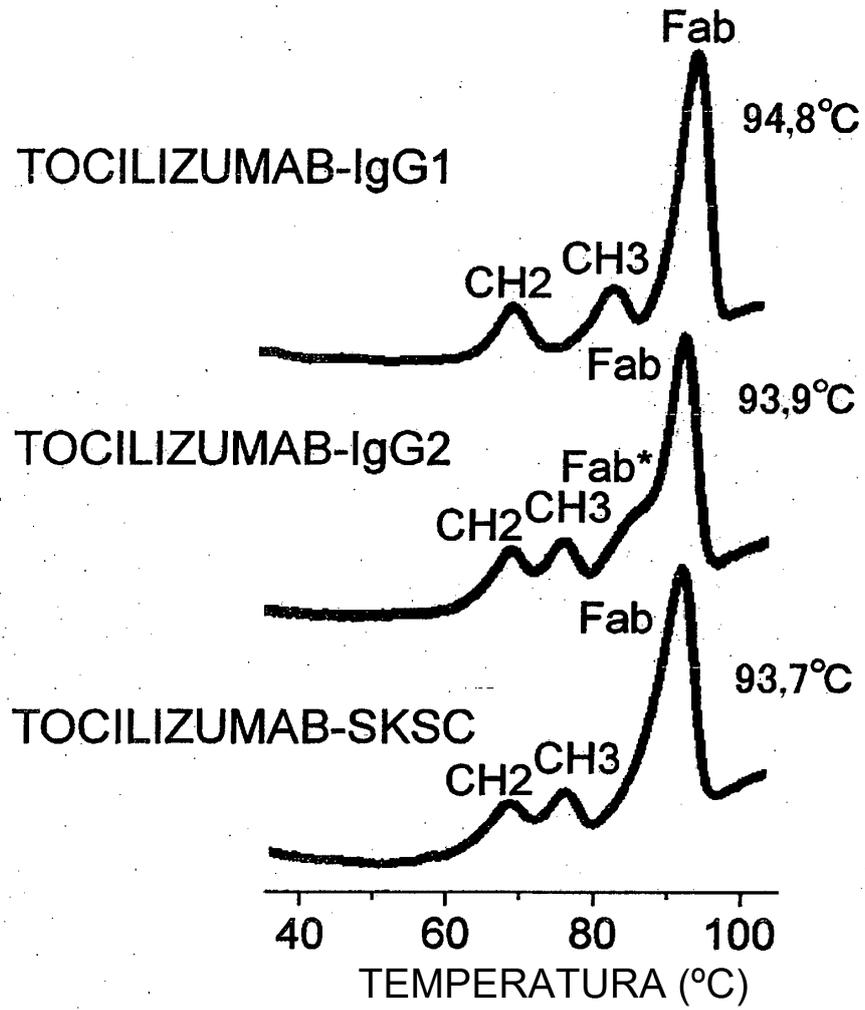


FIG. 14

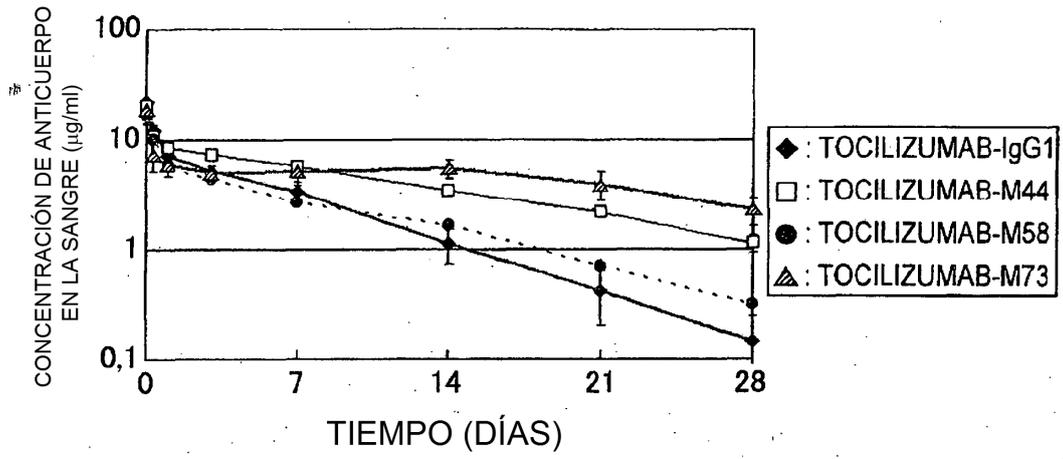


FIG. 15

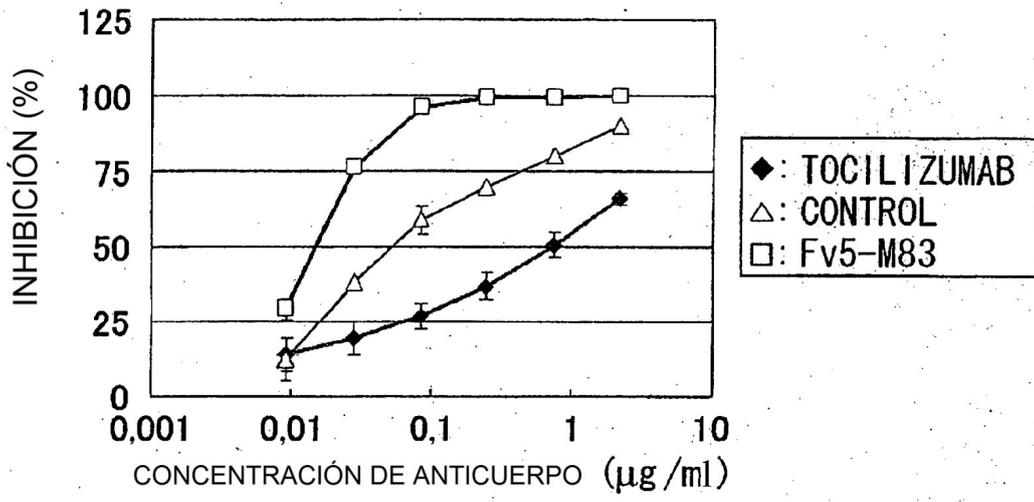


FIG. 16

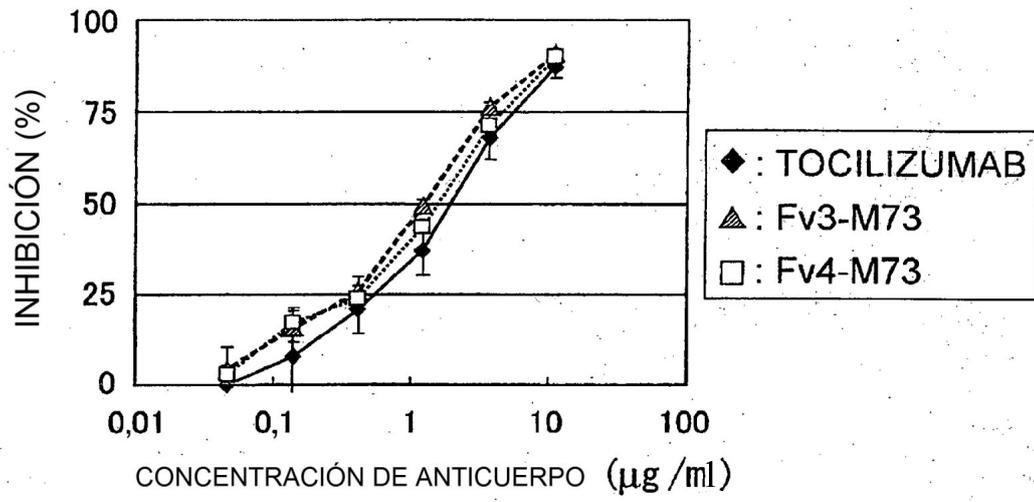


FIG. 17

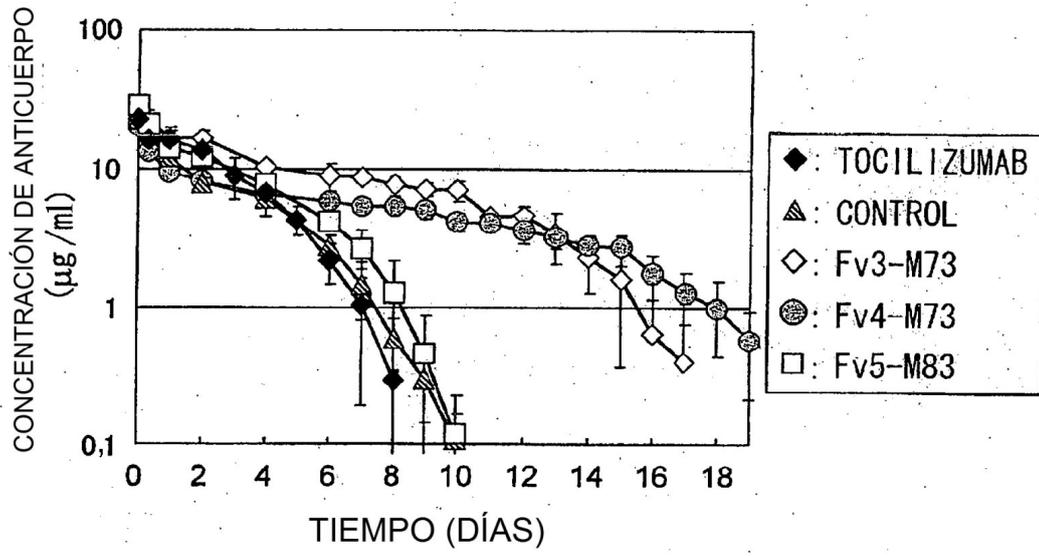


FIG. 18

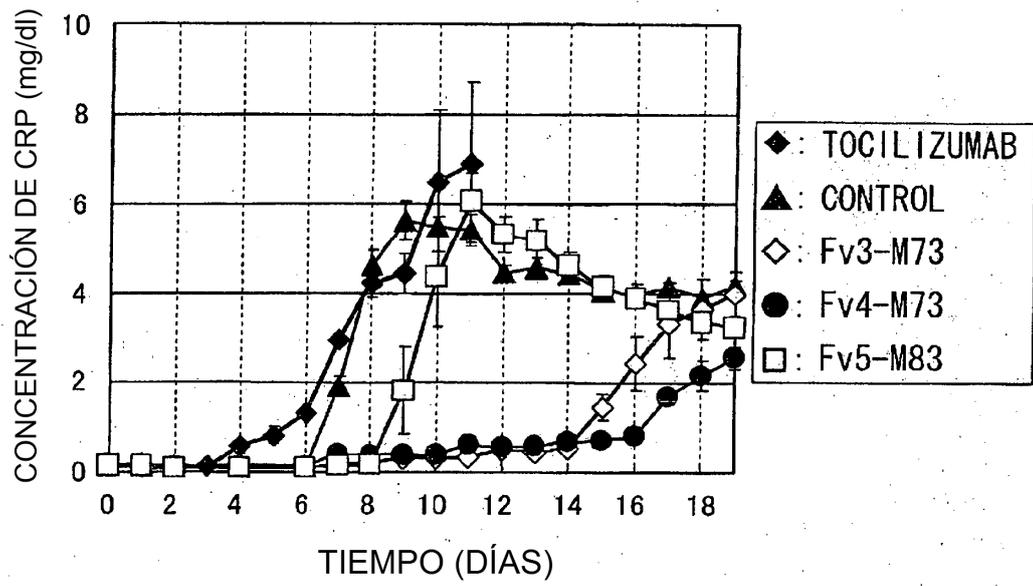


FIG. 19

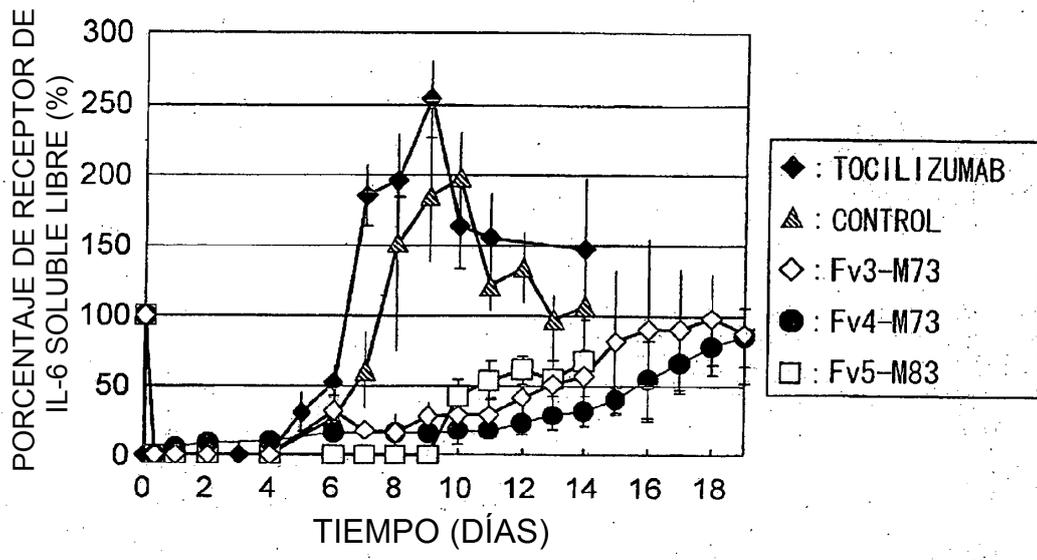


FIG. 20

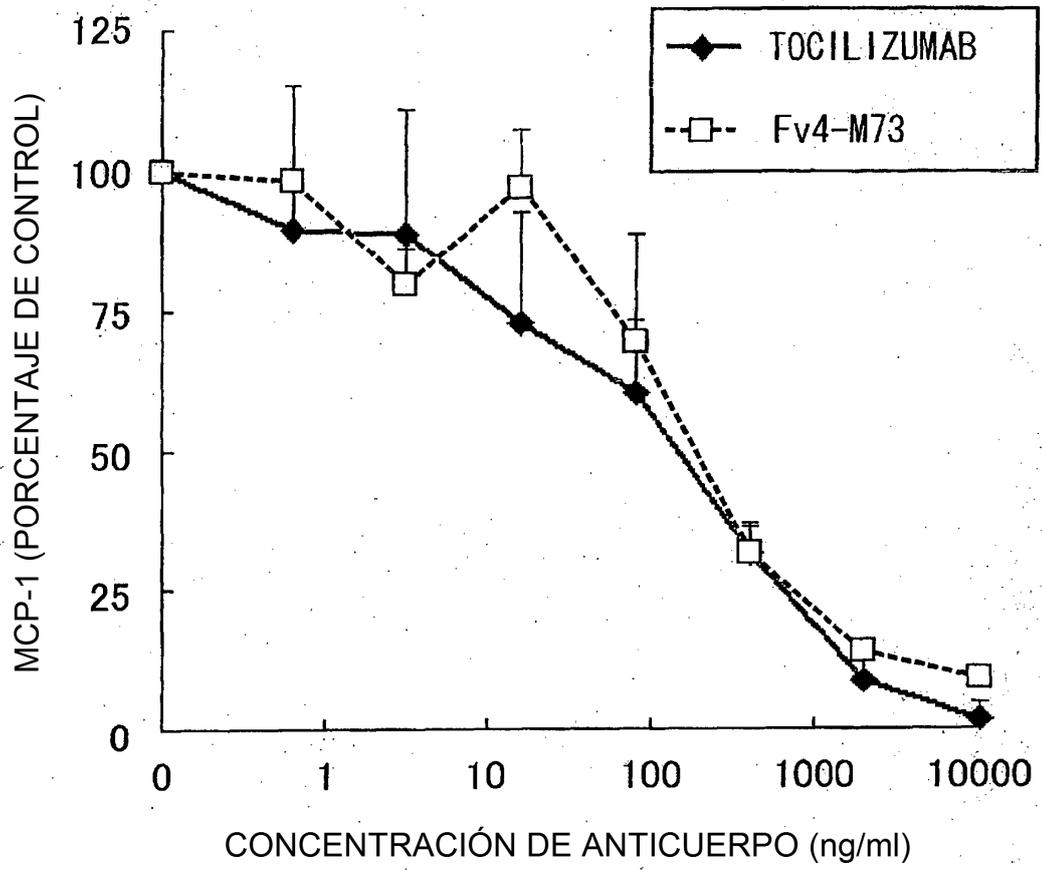


FIG. 21

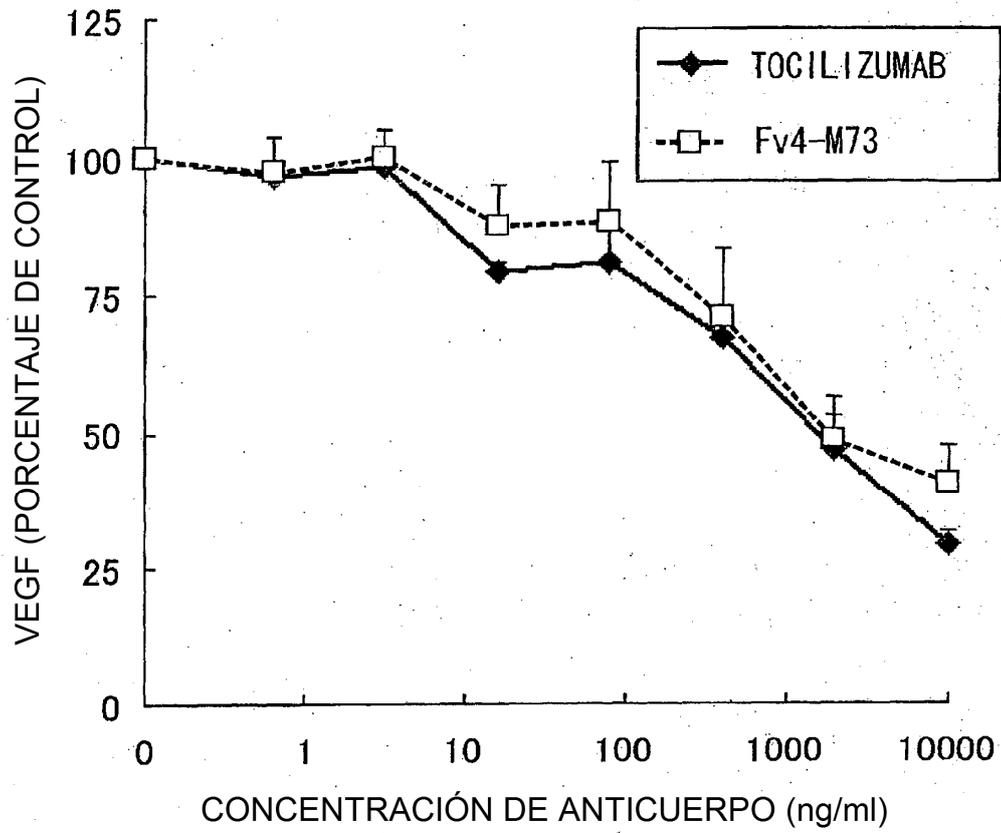


FIG. 22